



HAL
open science

Etude des facteurs influençant la dynamique de colonisation digestive par *Clostridioides difficile* et de la réponse immunitaire adaptative

Afi Akofa Diane Sapa

► To cite this version:

Afi Akofa Diane Sapa. Etude des facteurs influençant la dynamique de colonisation digestive par *Clostridioides difficile* et de la réponse immunitaire adaptative. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ058 . tel-04861207

HAL Id: tel-04861207

<https://theses.hal.science/tel-04861207v1>

Submitted on 2 Jan 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Etude des facteurs influençant la dynamique de la colonisation digestive par *Clostridioides difficile* et de la réponse immune adaptative

Study of factors influencing the dynamics of digestive colonization by Clostridioides difficile and the adaptive immune response

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : HeaDS, Santé et médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie.

Thèse préparée dans l'unité de recherche **BaPS Team, Micalis institute, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay**
sous la direction d'**Alban LE MONNIER**, PU-PH,
le co-encadrement d'**Anaïs BROSE**, MCU

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 08 décembre 2023, par

Afi Akofa Diane SAPA

Composition du Jury

Jean-Ralph ZAHAR PU-PH, Université Paris Sorbonne Nord	Président
Hélène MARCHANDIN PU-PH, Université de Montpellier	Rapportrice
Anne-Judith WALIGORA-DUPRIET MCU, Université Paris-Cité	Rapportrice
Marie-Lise GOUGEON Professeur, Institut Pasteur Paris	Examinatrice
Claire MORVAN MCU, Institut Pasteur Paris, Université Paris-Cité	Examinatrice

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de donner de leur temps pour évaluer mes travaux de thèse. Je remercie Anne-Judith Waligora-Dupriet et Hélène Marchandin d'avoir accepté d'être rapportrices de cette thèse ainsi que Marie-Lise Gougeon, Claire Morvan et Jean-Ralph Zahar d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie également Antonia Suau-Pernet, Delphine Sterlin et Laetitia Pereira dont les remarques et les suggestions lors de mon comité de suivi individuel ont grandement contribué à l'amélioration de ce travail.

Mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, Alban Le Monnier, pour m'avoir accordé sa confiance dans la gestion de ce projet multidisciplinaire. Merci pour tes conseils, ta disponibilité et ton soutien depuis mon Master 2.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers ma co-encadrante de thèse, Anaïs Brosse, sans qui cette thèse ne se serait pas déroulée aussi fluidement. Merci pour ta disponibilité, tes encouragements, ton encadrement exceptionnel et ta rigueur. Nos moments passés à organiser la manip du siècle, les weekends et jours fériés passés à Chatenay-Malabry avec les « voitures » capricieuses resteront inoubliables. Je reste très admirative de ta passion pour la science, le voyage, la gastronomie... Merci pour ton aide précieuse pour la rédaction de cette thèse ainsi que pour tes retours constructifs et bienveillants. Ahh j'oubliais, merci de m'avoir rendu accro au Poké Bowl !

Un grand merci à Claire Janoir de m'avoir accueillie dans son laboratoire depuis mon stage de Master 1 en 2019.

Mes remerciements vont également à l'axe ATB-DRI. Merci à Gauthier Pean De Ponfilly pour les mille plaques ELISA. Merci à Assaf Mizrahi et Benoit Pilmis pour leur aide, la relecture des manuscrits et leurs conseils. Je remercie infiniment Aurélie Baliarda pour sa bienveillance et les échanges fructueux qui ont fait avancer ma réflexion tant sur le plan scientifique que personnel. Un grand merci à Laura Obry pour son soutien indéfectible ces derniers temps, sa bonne humeur contagieuse, son grain de folie et sa gentillesse.

Un merci tout particulier à Thomas Candela pour m'avoir ouvert les portes de BaPS. Mille mercis pour ta disponibilité, tes conseils, ta bienveillance et pour ton optimisme. *Grazie di tutto il cuore, sei stato un grande sostegno sin dall'inizio, è stato un grand piacere di avere lavorato con te. Spero di avere l'opportunità di lavorare di nuovo con te.*

Merci à Jessica Le Ven pour m'avoir accueilli à la plateforme de dosage du groupe hospitalier Paris Saint-Joseph et encadré pour le développement de la méthode de dosage des acides biliaires.

Je remercie également Héloïse Coullon pour son soutien, la relecture des manuscrits en anglais et pour toujours répondre lorsque je crie « *HELP ME* ».

Je remercie chaleureusement Sandra Hoys pour son aide précieuse lors des expérimentations animales depuis mon Master 2. Merci d'avoir été disponible les week-ends, les jours fériés et pendant tes jours de repos pour m'aider. Merci également à Sylvie Lambert, Myriam, Manu, Laïla et Sarah pour leur aide.

Un immense merci à l'équipe exceptionnelle BaPS : Cécile Larrazet, Imad Kansau, Jean-Christophe Marvaud, Marie Françoise Bernet-Camard, Séverine Péchine et Sylvie Bouttier pour leur accueil, leur soutien, leur gentillesse et leur votre bonne humeur. Et bien sûr, un grand merci à notre remarquable secrétaire Bruno Kalama.

Je souhaite remercier tous les doctorants et stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer, en particulier Jeanne, Hiba et mon voisin de bureau PhD PharmaD Pierre-Alexandre. Merci Tania pour nos moments partagés autour d'un Poké Bowl et nos discussions enrichissantes. Un très grand merci à Magali, Léa, Laetitia et Lélé pour leurs encouragements, leur soutien, et les moments de fous rires ! Je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Mes remerciements vont à toutes les merveilleuses personnes que j'ai rencontrées au cours de ces dernières années : Nathalie, Dodzi, Israël, Jean-Paul, Guy, Georgia, Antonin, Harold, Ardo, Pascaline, Jerdy, Yvan, la liste est longue. Vos encouragements, votre confiance et soutien moral ont contribué à la réussite de cette thèse.

Mes remerciements vont également à ma famille, en particulier à mes tantes Blandine et Jasmine, mes oncles Cyrille et Bruno ainsi qu'à ma sœur « *da un'altra madre* » Christel, *Ti voglio bene* !

Pour finir, mes pensées vont à ma regrettée grand-mère Cécile Gaba. Son courage, sa persévérance, sa détermination à nous offrir le meilleur et ses enseignements m'ont permis d'être ce que je suis aujourd'hui. Cette thèse est pour toi, *mama*.

Akpé na mi kaka !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES ANNEXES.....	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	10
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	14
CHAPITRE I : <i>CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE</i>	14
A. Historique et classification.....	14
B. Aspects cultureux de <i>Clostridioides difficile</i>	16
C. Génétique de <i>Clostridioides difficile</i>	17
D. Cycle de vie de <i>Clostridioides difficile</i>	19
1. Les spores de <i>Clostridioides difficile</i>	19
1.1. Caractéristiques.....	19
1.2. Sporulation.....	20
1.3. Germination.....	22
2. La forme végétative de <i>Clostridioides difficile</i>	23
2.1. Les facteurs de colonisation.....	23
2.2. Les toxines de <i>Clostridioides difficile</i>	31
CHAPITRE II : LES INFECTIONS A <i>CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE</i>	45
A. Le cycle infectieux de <i>Clostridioides difficile</i>	45
B. La colonisation asymptomatique.....	46
C. Manifestations cliniques et évolution des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	47
D. Les facteurs de risque des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	50
E. Récidive des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	51

F.	Les facteurs de persistance et de dissémination de <i>Clostridioides difficile</i>	51
G.	Epidémiologie	53
H.	Diagnostic de l'infection à <i>Clostridioides difficile</i>	57
I.	Traitements des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	60
1.	Les traitements actuels des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	60
1.1.	Les antibiotiques actifs contre <i>Clostridioides difficile</i>	60
1.2.	Les autres antibiotiques ciblant <i>Clostridioides difficile</i>	64
2.	Les traitements alternatifs aux antibiotiques ciblant <i>Clostridioides difficile</i> actuellement recommandés.....	66
2.1.	Transplantation du microbiote fécal.....	66
2.2.	L'immunothérapie par le bezlotoxumab	68
3.	Les recommandations de l'ESCMID.....	69
4.	Les nouvelles perspectives de prise en charge des infections à <i>Clostridioides difficile</i>	71
4.1.	Les probiotiques « traditionnels ».....	71
4.2.	Thérapies basées sur le microbiome (" <i>Microbiome-based therapeutics</i> ").....	72
5.	Les stratégies de prévention de la survenue d'ICD	76
5.1.	Dispositif de préservation du microbiote intestinal	76
5.2.	Stratégies de prévention des ICD par la vaccination	77

CHAPITRE III : LES FACTEURS INFLUENÇANT LA DYNAMIQUE DE COLONISATION DIGESTIVE PAR *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* 81

A.	Etat d'eubiose	81
1.	Le microbiote intestinal.....	81
1.1.	Généralités	81
1.2.	Les différentes méthodes d'étude du microbiote intestinal	82
1.3.	Structure et composition des bactéries dans le tube digestif	87
1.4.	Les différentes fonctions du microbiote intestinal	90
1.5.	Le développement du microbiote intestinal	93
1.6.	Les facteurs qui influencent la composition du microbiote intestinal.....	96
2.	Le métabolisme des acides biliaires	97
2.1.	Structure et classification des acides biliaires	97
2.2.	Synthèse des acides biliaires	98
2.3.	Circulation entéro-hépatique des acides biliaires	98
2.4.	Biotransformation des acides biliaires par le microbiote intestinal	99
2.5.	Impact des acides biliaires sur les bactéries du microbiote digestif.....	101
3.	La réponse immune	102
3.1.	La mise en place de la réponse immune innée.....	102
3.2.	La mise en place de la réponse immune adaptative	103

B.	La dysbiose.....	106
1.	Impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal.....	106
2.	Impact des antibiotiques sur le métabolome intestinal.....	108
3.	Impact des antibiotiques sur la réponse immunitaire.....	109
4.	Conséquences de l'altération du microbiote intestinal sur les infections à <i>Clostridioides difficile</i> 109	
4.1.	Le microbiote dans les infections à <i>Clostridioides difficile</i>	110
4.2.	Les acides biliaires dans les infections à <i>Clostridioides difficile</i>	111
4.3.	La réponse immunitaire dans les infections à <i>Clostridioides difficile</i>	112
C.	Modèles expérimentaux d'étude de la physiopathologie des infections à <i>Clostridioides difficile</i> .	119
1.	Comparaison du modèle souris par rapport à l'Homme.....	121
1.1.	Comparaison du microbiote intestinal.....	121
1.2.	Comparaison de la synthèse des acides biliaires.....	124
2.	Etude du microbiote dans les ICD chez la souris.....	125
3.	Etude des acides biliaires dans les ICD chez la souris.....	128
4.	Etude de la réponse immunitaire dans les ICD chez la souris et dans les lignées cellulaires.....	130
4.1.	Réponse immunitaire innée.....	131
4.2.	Réponse immunitaire adaptative.....	134
	TRAVAUX PERSONNELS.....	141
A.	Contexte.....	141
B.	Objectifs de la thèse.....	141
C.	Plan des résultats.....	141
	RESULTATS.....	145
	CHAPITRE I : PRODUCTION ET PURIFICATION DES TOXINES RECOMBINANTES DE <i>C. DIFFICILE</i>	145
	CHAPITRE II : ETUDE DE L'IMPACT DES ANTIBIOTIQUES D'INTERET CLINIQUE SUR LA DYNAMIQUE DE LA COLONISATION DIGESTIVE PAR <i>CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE</i> CHEZ LA SOURIS, SUR LA REponse IMMUNE ADAPTATIVE ET SUR LE MICROBIOTE DIGESTIF.....	170
A.	Contexte.....	170
B.	Présentation générale du protocole infectieux.....	170

C. Chapitre II partie A : Impact de différents antibiotiques sur la dynamique de la colonisation digestive par <i>Clostridioides difficile</i> et sur la réponse immune adaptative	175
1. Présentation générale de l'article	175
2. Complément de l'article	200
D. Chapitre II partie B : Impact de différents antibiotiques sur la modulation du microbiote digestif en réponse à l'infection par <i>Clostridioides difficile</i>	202
1. Contexte	202
2. Matériels et méthodes	202
3. Résultats	205
4. Conclusion.....	222
CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES ACIDES BILIAIRES DANS DES ECHANTILLONS COMPLEXES.....	223
A. Contexte.....	223
B. Matériels et méthodes.....	223
C. Résultats	229
D. Conclusion.....	236
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	238
CONCLUSION	252
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	255
ANNEXES.....	306

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénique des <i>Clostridium spp.</i> basé sur le gène codant l'ARNr 16S	15
Figure 2 : Principaux faits marquants dans l'histoire des infections à <i>C. difficile</i> .	16
Figure 3 : Colonies de <i>C. difficile</i> sur gélose CLO (A) présentant un aspect de verre fritté et (B) jaune/vert pâle observées sous lumière ultraviolette et un grossissement montrant l'aspect en verre brisé.	17
Figure 4 : Technique de mutation par échange allélique.	18
Figure 5 : Structure de la spore de la souche de référence 630 Δ erm de <i>C. difficile</i> , observation en microscopie électronique à transmission	20
Figure 6 : Différentes étapes de la sporulation chez <i>C. difficile</i> (analogue des étapes trouvées chez <i>Bacillus subtilis</i>).	21
Figure 7 : Représentation de 29 protéines de surface Cwps de la souche 630 de <i>C. difficile</i> .	24
Figure 8 : Représentation du précurseur de la couche S, SlpA et de sa voie de sécrétion.	26
Figure 9 : Le flagelle de <i>C. difficile</i>	28
Figure 10 : Représentation de la structure d'un flagelle bactérien	29
Figure 11 : Représentation du PaLoc de <i>C. difficile</i> .	32
Figure 12 : Représentation de la régulation de l'expression des toxines.	32
Figure 13 : Structure de la toxine B de <i>C. difficile</i>	36
Figure 14 : Structure de la toxine A de <i>C. difficile</i>	37
Figure 15 : Représentation du mécanisme d'action de TcdA et TcdB	39
Figure 16 : Représentation du locus CDTloc et des composants de CDTa et CDTb	41
Figure 17 : Représentation du mécanisme d'action des CDT	42
Figure 18 : Le cycle infectieux de <i>C. difficile</i> .	45
Figure 19 : Colite pseudomembraneuse chez un patient ICD.	48
Figure 20 : Les étapes de la formation d'un biofilm.	52
Figure 21 : Représentation d'un modèle de biofilm de <i>C. difficile</i> pendant l'infection.	53
Figure 22 : Distribution géographique des ribotypes de <i>C. difficile</i> dans le monde.	55
Figure 23 : Cycle de transmission de <i>C. difficile</i> .	57
Figure 24 : Exemple de test rapide pour la détection de <i>C. difficile</i> et des toxines libres dans les selles (ALERE C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE Test®).	59
Figure 25 : Algorithme décisionnel pour le diagnostic de l'ICD.	59
Figure 26 : Stratégies thérapeutiques alternatives aux antibiotiques ciblant <i>C. difficile</i> .	66
Figure 27 : Les recommandations 2021 de l'ESCMID pour le traitement des infections à <i>C. difficile</i> .	70
Figure 28 : Répartition des principaux phylums du microbiote en fonction des différents sites de l'organisme humain.	81
Figure 29 : Représentation de l'analyse du microbiote par la métagénomique ciblée (basé sur le gène codant l'ARN ribosomal 16S) ou par la métagénomique globale ou "Shotgun".	84
Figure 30 : Schéma représentatif de l'ADNr 16S des procaryotes	84
Figure 31: Composition du microbiote intestinal d'un individu sain.	88
Figure 32: Variation de la composition du microbiote intestinal tout au long du tube digestif.	89
Figure 33 : Les différents mécanismes de résistance à la colonisation du microbiote intestinal.	90
Figure 34 : Fonction barrière de la muqueuse intestinale	92

Figure 35 : Développement du microbiote dans les 3 premières années de vie.	95
Figure 36 : Structure des acides biliaires les plus prévalents chez l'Homme.	97
Figure 37 : Circulation entéro-hépatique des acides biliaires.	99
Figure 38 : Proportion des acides biliaires dans la vésicule biliaire et dans les selles chez l'Homme.	100
Figure 39 : Immunité de l'hôte stimulée par le microbiote.	103
Figure 40 : Impact de la dysbiose induite par les antibiotiques sur le microbiote intestinal et ses fonctions.	107
Figure 41 : Réponse immune innée et adaptative induite par les toxines de <i>C. difficile</i> .	112
Figure 42 : Liste des 20 genres centraux retrouvés dans les échantillons fécaux chez la souris (a) et chez l'Homme (b).	121
Figure 43 : La synthèse des acides biliaires primaires et secondaires retrouvé chez l'Homme et la souris.	124
Figure 44 : Immunité innée et adaptative induit par les SLPs.	133
Figure 45 : Protocole infectieux appliqué pour les différents groupes de souris	172
Figure 46 : Cellules productrices d'immunoglobulines contre la flagelline FliC, la sous-unité LMW de SlpA et d'immunoglobulines totales dans les plaques de Peyer et dans la rate.	201
Figure 47 : Protocole infectieux et plan d'échantillonnage pour l'analyse du microbiote.	203
Figure 48 : Les principales étapes de l'analyse bio-informatique du microbiote intestinal.	204
Figure 49 : Représentation de l'abondance relative des phylums majeurs (A) et de quelques familles bactériennes (B) du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX prélevé à J-6 et à J0.	206
Figure 50 : Représentation de l'abondance relative du genre <i>Clostridioides</i> dans les échantillons de 4 souris prélevés à J-6, J0, J2, J5, J7, J14, J28, J37, J39 et J51.	207
Figure 51 : Détection de <i>C. difficile</i> par PCR spécifique sur l'ADN extrait des selles des souris du groupe contrôle à J28, J37 (J0 bis) et J39 (J2 bis).	208
Figure 52 : Représentation de la diversité alpha par la richesse observée et l'indice de Shannon dans les groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX.	209
Figure 53 : Représentation de la diversité alpha ajustée par un modèle d'analyse de la variance dans les groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX.	210
Figure 54 : Représentation MDS « <i>Multidimensional Scaling</i> » avec les mesures de la diversité bêta Jaccard et Bray-Curtis.	211
Figure 55 : Représentation de l'abondance relative des phylums du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.	212
Figure 56 : Représentation de l'abondance relative des familles majeures du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.	214
Figure 57 : Représentation de l'abondance relative des <i>Escherichia-Shigella</i> dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.	215
Figure 58 : Représentation de l'abondance relative des <i>Blautia</i> dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.	216
Figure 59 : Représentation de l'abondance relative des <i>Bacteroides</i> dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.	217

Figure 60 : Représentation de l'abondance relative des <i>Akkermansia</i> dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.	218
Figure 61 : Représentation de l'abondance relative du genre <i>Alistipes</i> dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.	219
Figure 62 : Représentation de la mesure de la diversité alpha par la richesse observée dans les groupes CTRL et R.	220
Figure 63 : Représentation de l'abondance relative des phylums du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL et R.	221
Figure 64 : Représentation de Fischer et espèces d'origine des 16 acides biliaries primaires et secondaires utilisés comme référence dans le développement de la méthode.	225
Figure 65 : Protocole d'extraction des acides biliaries dans un échantillon de selle de souris.	228
Figure 66 : Protocole infectieux subi par les souris des différents groupes.	229
Figure 67 : Temps d'élution des acides biliaries de référence.	230
Figure 68 : Comparaison des aires sous la courbe des pics de chromatographie de quatre acides biliaries deutérés en fonction de la méthode d'extraction des acides biliaries d'un échantillon de contenu caecal de la souris.	232
Figure 69 : Comparaison des aires sous la courbe de pics chromatographiques d'acides biliaries en fonction de la méthode de séchage des selles avant l'extraction.	233
Figure 70 : Suivi de la colonisation par <i>C. difficile</i> de selles de souris utilisées pour l'essai de profilages des acides biliaries.	234
Figure 71 : Profilage des acides biliaries primaires et secondaires dans les selles de souris infectées par <i>C. difficile</i> .	235

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemple des principaux critères permettant de catégoriser les formes sévères d'ICD.	49
Tableau 2 : Avantages, inconvénients et cibles des différentes méthodes de diagnostic d'ICD et leurs interprétations.	58
Tableau 3 : Comparaison des principaux antibiotiques actifs contre <i>C. difficile</i> .	64
Tableau 4 : Essais cliniques des candidats vaccins anti-toxines chez l'Homme.	78
Tableau 5 : Les avantages et les limites du modèle souris pour l'étude du microbiote intestinal.	123
Tableau 6: Les principaux acides biliaires produits chez l'Homme et la souris et leur impact sur <i>C. difficile</i> .	129
Tableau 7 : Les protéines de surface de <i>C. difficile</i> utilisées dans les essais d'immunisation passive et active chez l'animal.	136
Tableau 8 : Gradient d'élution pour la séparation des acides biliaires	226
Tableau 9 : Concentration de standards internes utilisées pour les extractions	227
Tableau 10 : Temps de rétention de chaque acide biliaire de référence sur la colonne C18 et le ratio masse sur charge des isomères (m/z) [M=H] ⁺ .	231

Liste des annexes

Annexe 1 : Characterization of natural systemic and mucosal humoral immune responses to <i>Clostridioides difficile</i> infection in mice (article en preparation)	306
Annexe 2 : Purification des protéines de surface SlpA et FliC.	325
Annexe 3 : Protocole d'ELISPOT	328
Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir de selles avec le kit Qiagen [®] (QIAamp Fast DNA Stool ; ref 51604)	330
Annexe 5 : Liste des échantillons séquencés pour l'analyse de la modulation du microbiote intestinal	332
Annexe 6 : Posters et communications orales	338

Liste des abréviations

ASID : *Australasian Society of Infectious Diseases*
CDT : *Clostridioides difficile Transferase*
CLO : *Clostridium difficile Agar*
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPD : *Cysteine Protease Domain*
CPM : *Colites Pseudomembraneuse*
CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*
CROPs : *Combined Repetitive Oligopeptides*
CSPG4 : *Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4*
CWPs : *Cell Wall Proteins*
DO: Densité Optique
DRBD : *Delivery and Receptor-Binding Domain*
ECDC : *European Centre for Disease Prevention and Control*
EIA : Test immuno-enzymatique
ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
ESCMID : *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*
Fbp : *Fibronectin binding protein*
FDZ : *Frizzled Proteins*
GALT: *Gut Associated Lymphoid Tissu*
GDH : *Glutamate déshydrogénase*
GTD : *Glycosyltransferase Domain*
ICD : *Infection à Clostridioides difficile*
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukine
IP: Intra-péritonéal
LCTs : *Large Clostridial glucosylating Toxins*
NF- κ B : *Nuclear factor Kappa B*
NOD : *Nucleotide-binding oligomerization domain*
PaLoc : *Pathogenicity Locus*
PVRL3 : *Poliovirus Receptor Like 3*
RT : Ribotype
SLPs : *S-Layer Proteins*
TcdA/B : *Toxines A et B de Clostridioides difficile*
TLR : *Toll-Like Receptor*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*
UFC : Unité Formant Colonie
WT : *Wild Type*

INTRODUCTION

Clostridioides difficile anciennement connu sous le nom de *Clostridium difficile* est un bacille Gram positif anaérobie strict. En 1978, *C. difficile*, initialement considéré comme commensal de l'hôte, a été identifié comme la principale cause des colites pseudomembraneuses (CPM) et des diarrhées post-antibiotiques. Actuellement, *C. difficile* est responsable de 15-25% des diarrhées post-antibiotiques chez l'adulte et de plus de 95% des CPM. L'utilisation excessive d'antibiotiques à large spectre, notamment les fluoroquinolones, serait à l'origine de l'émergence de nouvelles souches hypervirulentes, notamment la souche BI/NAP1/027 qui a été isolée pour la première fois en France en 1988 chez une patiente âgée de 28 ans présentant une CPM sévère. L'émergence de ces souches résistantes aux fluoroquinolones a entraîné des changements significatifs dans l'épidémiologie des infections à *C. difficile* (ICD). Ces souches ont été associées à une augmentation importante de l'incidence, à des complications graves et une mortalité élevée au début des années 2000 dans les hôpitaux aux Etats-Unis, au Canada et plus tard dans des pays de l'Europe tels que la Belgique, l'Angleterre, les Pays-Bas et la France.

Au cours des dernières années, les ICD, autrefois principalement associées aux établissements de soins, ont été de plus en plus mises en évidence en communautaire avec une augmentation des cas liés à la contamination de l'environnement, notamment par le sol, l'eau, les aliments, les animaux de compagnie et ceux destinés à l'alimentation. Ainsi, *C. difficile* est désormais responsable non seulement de diarrhées nosocomiales post-antibiotiques mais également d'ICD communautaires chez les jeunes et les adultes. L'âge avancé et la présence de comorbidités chez l'hôte représentent des facteurs de risque importants pour le développement des ICD.

Actuellement, *C. difficile* représente une menace majeure pour la santé publique. Le principal risque d'infection à *C. difficile* est l'utilisation d'antibiotiques à large spectre qui perturbent l'équilibre du microbiote digestif et modulent ses fonctions associées, en particulier la diminution des espèces impliquées dans la biotransformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. La prédominance des acides biliaires primaires va favoriser la germination des spores de *C. difficile* en formes végétatives, ce qui permet à la bactérie de coloniser le tube digestif, de se multiplier et produire des facteurs de virulence, notamment les toxines TcdA et TcdB qui seront responsables des signes cliniques de l'infection. Il a été montré que l'évolution de l'infection allant de simples diarrhées à des formes sévères voire des complications pouvant entraîner la mort du patient serait associée à la mise en place de la réponse immune adaptative dirigée contre les toxines de *C. difficile*. De plus, il existe au sein de la population des colonisations asymptomatiques pour lesquelles, un taux élevé d'anticorps dirigés contre les toxines aurait un effet protecteur contre le développement des symptômes

d'ICD. Ainsi, la survenue et l'évolution des ICD sont multifactorielles et dépendent à la fois de l'état du microbiote intestinal de l'hôte mais aussi de sa réponse immune.

L'évolution récente des outils moléculaires ont d'abord permis de modifier génétiquement les souches de *C. difficile* afin de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliquant des facteurs de virulences mais aussi améliorer les connaissances concernant les différents processus impliqués dans la physiopathologie de l'infection. De plus, les recherches récentes ont aussi permis d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de lutter de contre *C. difficile* notamment la transplantation du microbiote fécal permettant de restaurer le microbiote intestinal et ses fonctions associées ou encore l'immunothérapie basée sur la neutralisation de l'activité cytotoxique des toxines. Cependant, le caractère de récurrence de l'infection par ce pathogène et sa capacité à persister sous forme de spores et de biofilms rendent difficile le traitement des ICD et soulèvent de nouvelles questions scientifiques.

Par conséquent, une meilleure compréhension des facteurs favorisant l'implantation de *C. difficile* et de la réponse de l'hôte face à cette infection est donc essentielle pour optimiser les stratégies de prévention et de traitement.

Ainsi, ce projet de thèse comprend deux volets principaux : l'étude des facteurs importants de la réponse immune adaptative au cours de l'ICD et l'impact du microbiote dans la colonisation digestive et la survenue d'une ICD.

Je vais dans un premier temps présenter une revue de la littérature sur *C. difficile* et ses facteurs de virulence, la physiopathologie et les manifestations cliniques des ICD, les facteurs de risque, l'épidémiologie associée à l'infection ainsi que les traitements actuels et en cours de développement. Ensuite, j'aborderai les différents rôles du microbiote intestinal et de la réponse immune adaptative de l'hôte dans la survenue et l'évolution de l'infection.

Dans les travaux présentés dans cette thèse, nous avons utilisé un modèle colonisation et d'infection chez la souris pour évaluer l'impact des antibiotiques utilisés dans le traitement des ICD tels que la vancomycine, la fidaxomicine et le métronidazole sur la dynamique de la colonisation digestive par *C. difficile*. Nous avons examiné également la modulation de la réponse immune adaptative dirigée contre les toxines TcdA et TcdB ainsi que les protéines de surface SlpA et FliC qui jouent un rôle important dans la colonisation du tube digestif par *C. difficile*. Ensuite, nous avons analysé la modulation du microbiote intestinal dans ces conditions. Enfin, nous avons souhaité étudier la modification du profil des acides biliaires dans les selles pendant l'ICD.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons développé et utilisé plusieurs outils. Tout d'abord, une méthode de production et de purification de toxines recombinantes TcdA et TcdB biologiquement actives chez *C. difficile*. Ensuite, nous avons réalisé une purification des

protéines de surface SlpA et FliC à partir de souches recombinantes disponibles au laboratoire. De plus, nous avons mis au point une méthode ELISA quantitative pour analyser la modulation de la réponse immune adaptative. Enfin, nous avons collaboré avec la plateforme de dosage de l'hôpital Paris Saint Joseph pour développer une méthode de dosage des acides biliaires dans les selles.

En conclusion, ce projet de thèse vise à améliorer notre compréhension des mécanismes de mise en place de l'infection à *C. difficile*.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : *Clostridioides difficile*

A. Historique et classification

Clostridioides difficile (*C. difficile*) est un bacille Gram positif anaérobie strict, décrit pour la première fois par Hall et O'Toole en 1935 après une analyse de la composition de la flore intestinale de nouveau-nés âgés de 2 à 10 jours (Hall and O'Toole, 1935). *C. difficile* a été nommé *Bacillus difficilis* à cause des difficultés rencontrées pour son isolement et pour sa culture au laboratoire.

C. difficile a été initialement classé dans le genre *Clostridium*, cependant, les différentes espèces incluses dans ce genre sont hétérogènes tant du point de vue phénotypique que phylogénétique. Les avancées sur les méthodes d'analyses moléculaires, notamment le séquençage de l'ADNr 16S ont permis de révéler cette hétérogénéité phylogénétique au sein du genre *Clostridium*.

Collins *et al.* en 1994 ont proposé une reclassification des différents groupes notamment les Clostridia basée sur le séquençage de leur ADNr 16S. Les espèces du genre *Clostridium* sont classées dans le cluster « *rRNA cluster I* » reconnu comme *Clostridium stricto sensu* (Collins *et al.*, 1994). Néanmoins, d'après les résultats de Collins *et al.*, *C. difficile* est retrouvé dans le même cluster (cluster XI) que d'autres *Clostridium* (*C. paradoxum* et *C. sticklandii*) et certaines espèces de la famille des *Peptostreptococcaceae* suggérant une similarité phénotypique entre *C. difficile* avec des espèces de cette famille (Figure 1).

Yutin et Galperin ont proposé en 2013 de renommer *Clostridium difficile* et les espèces proches en *Peptoclostridium spp* (Yutin and Galperin, 2013). D'un point de vue logistique, médical et économique, le changement de nom de *C. difficile* en *Peptoclostridium difficile* (*P. difficile*) représenterait un coup énorme et une confusion auprès des soignants et de la population générale.

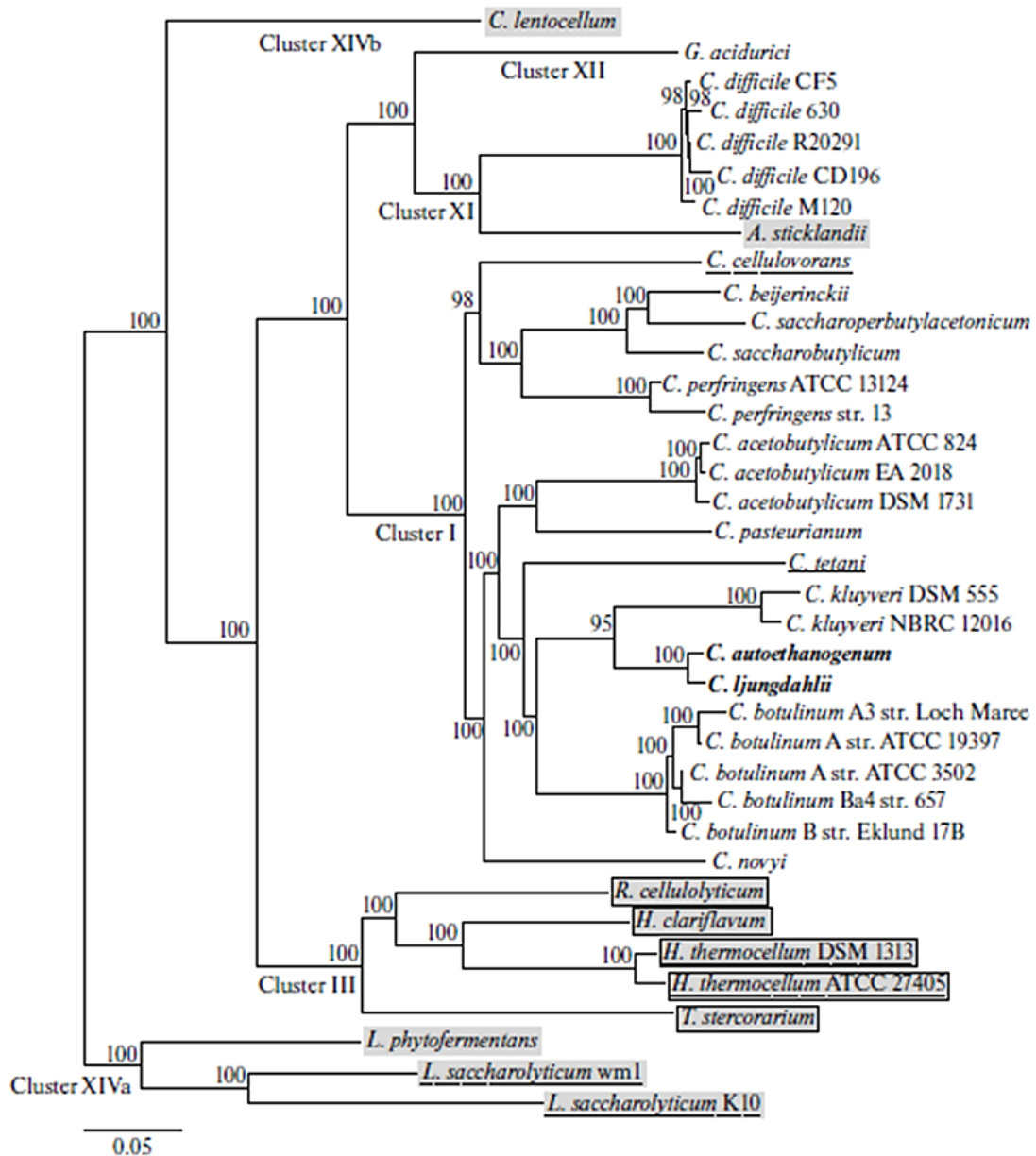


Figure 1 : Arbre phylogénique des *Clostridium* spp. basé sur le gène codant l'ARNr 16S
D'après (Yu *et al.*, 2019).

Ainsi, en 2015, Lawson *et al.*, ont proposé de créer un nouveau genre *Clostridioides* et de renommer *Clostridium difficile* en *Clostridioides difficile* (Lawson and Rainey, 2016). En 2016, *Clostridium difficile* a été officiellement renommé *Clostridioides difficile* reflétant ainsi les différences taxonomiques entre *C. difficile* et d'autres membres du genre *Clostridium* (Lawson *et al.*, 2016).

Initialement, *C. difficile* a été considéré comme un commensal de l'Homme. Son rôle en tant que pathogène était alors sous-estimé et seules deux études font référence à *C. difficile* chez

l'Homme entre 1940 et 1962, (Smith and King, 1962; Snyder, 1940). Ce n'est que dans les années 1970 qu'un lien a été décrit entre *C. difficile* et ses toxines et l'antibiothérapie chez les patients atteints de colite pseudomembraneuse (CPM), une maladie inflammatoire du côlon (George *et al.*, 1978; Lance George *et al.*, 1978; Larson *et al.*, 1978) (Figure 2). Actuellement, les infections à *C. difficile* (ICD) sont reconnues comme étant la principale cause de diarrhées associées à l'antibiothérapie chez l'adulte.

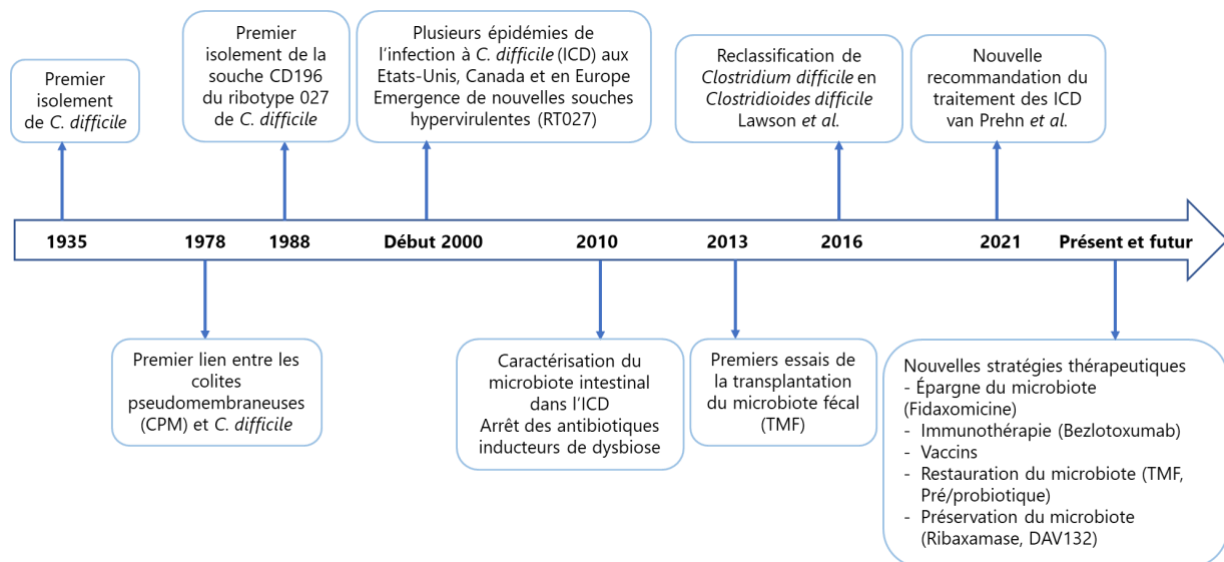


Figure 2 : Principaux faits marquants dans l'histoire des infections à *C. difficile*.

B. Aspects cultureux de *Clostridioides difficile*

C. difficile est caractérisé par des difficultés pour son isolement et sa culture au laboratoire. Tout d'abord, il s'agit d'une bactérie anaérobie stricte avec un temps de doublement qui se situe entre 40 et 70 min (Curry, 2010; Hall and O'Toole, 1935). *C. difficile* peut être isolé à partir d'un prélèvement polymicrobien sur milieux enrichis et sélectifs tels que le milieu CCFA (Cyclosérine, Céfoxitine, Fructose, jaune d'œuf) additionné ou non de taurocholate de sodium (Arroyo *et al.*, 2005). Il a été montré que l'addition d'un acide biliaire, le taurocholate de sodium, favorise la germination des spores de *C. difficile* (Wilson *et al.*, 1982). *C. difficile* peut également être cultivé dans/sur certains milieux BHI « Brain Heart Infusion » et TY « Tryptone Yeast » liquides ou gélosés.

Après isolement, *C. difficile* peut également être cultivé sur des milieux non sélectifs gélosés enrichis en sang de cheval. Après 24 - 48 heures d'incubation, *C. difficile* présente des colonies circulaires à bords irréguliers (3 - 5 mm), non hémolytiques, avec une odeur caractéristique de crottin de cheval due à la fermentation de la tyrosine en *p*-cresol, un composé phénolique (Dawson *et al.*, 2008; Sivsammeye and Sims, 1990). Les colonies présentent un aspect de verre fritté à la loupe binoculaire (Figure 3A).

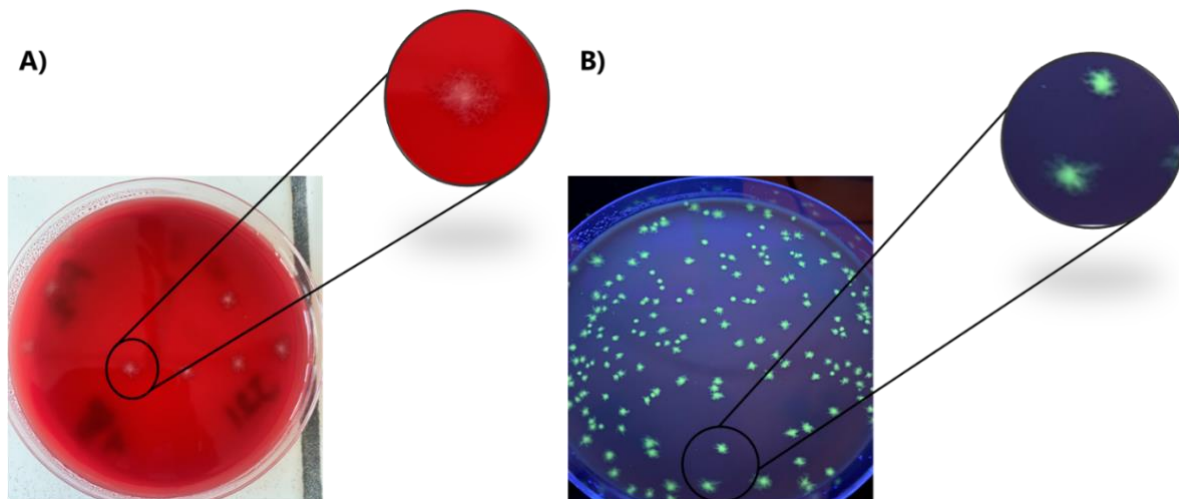


Figure 3 : Colonies de *C. difficile* sur gélose CLO (A) présentant un aspect de verre fritté et (B) jaune/vert pâle observées sous lumière ultraviolette et un grossissement montrant l'aspect en verre brisé.

Images issues de ces travaux de thèse.

Sous lumière ultraviolette à 365 nm et sur certains milieux, notamment sur la gélose CLO « *Clostridium difficile* Agar », les colonies de *C. difficile* fluorescent et donnent des colonies jaune/vert pâle (Figure 3B) (Levett, 1985).

Ces milieux sont sélectifs pour s'affranchir d'une grande partie des bactéries commensales du microbiote digestif. De plus, la gélose chromogène, ChromID (BioMérieux®) contient aussi du taurocholate permettant la germination des spores et permet la mise en évidence des colonies de *C. difficile* qui apparaissent noires.

C. Génétique de *Clostridioides difficile*

Le développement des outils génétiques chez *C. difficile* sont relativement récents en raison de la complexité de manipulation de ce microorganisme mais sont indispensables afin de mieux comprendre la physiologie de ce pathogène, déterminer les facteurs de colonisation et de virulence impliqués pour à terme développer des stratégies thérapeutiques optimisées. Les innovations en génétique microbienne ont été transposées avec un délai parfois important chez *C. difficile*. Par exemple, les systèmes de recombinaison homologe sont utilisés depuis de nombreuses décennies chez les organismes modèles tels qu'*Escherichia coli*. En revanche, cette technique n'a été possible que dans les années 2010 pour *C. difficile*.

La manipulation génétique de *C. difficile* est principalement effectuée en utilisant le système ClosTron/TargeTron (Heap *et al.*, 2007) ou plus couramment depuis quelques années l'échange allélique (Cartman *et al.*, 2012; Faulds-Pain and Wren, 2013).

Plus en détail, l'objectif de la technique de l'échange allélique utilisée dans cette thèse (Figure 4) consiste à modifier une portion du génome (insertion/délétion) en utilisant un plasmide pseudo-suicide, transféré dans *C. difficile* depuis une souche donneuse d'*Escherichia coli* par conjugaison, suivi de deux étapes de recombinaison homologue (Cartman *et al.*, 2012; Faulds-Pain and Wren, 2013).

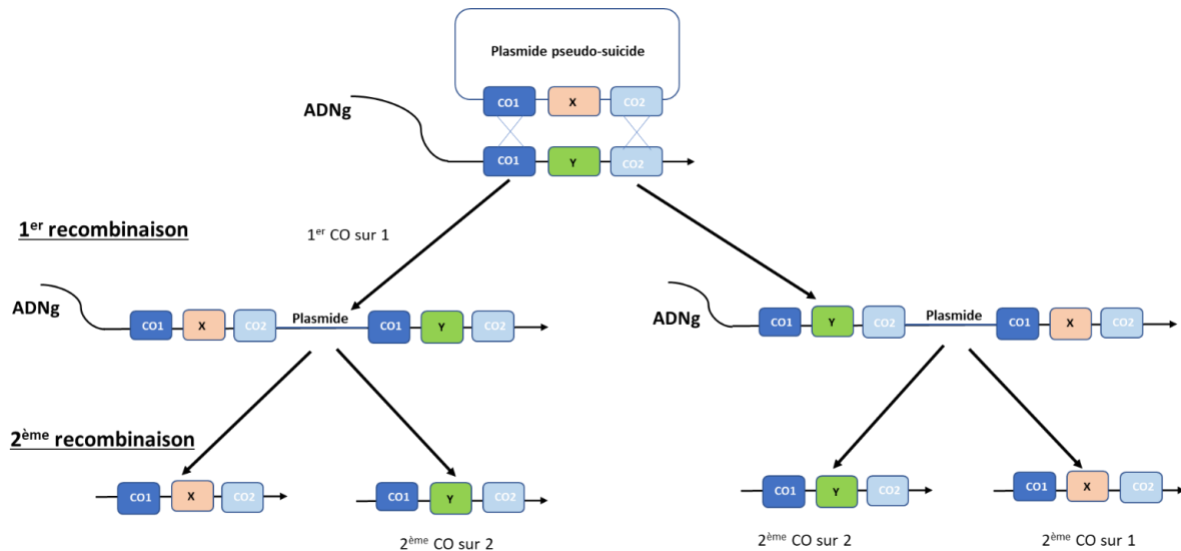


Figure 4 : Technique de mutation par échange allélique.

Représentation des situations possibles à l'issue de la première et seconde recombinaison par la technique de l'échange allélique. X = mutant ; Y = gène WT, CO1 = zone homologue 1, CO2 = zone homologue 2, 1^{er} CO sur 1 (2) = premier « *crossing over* » (recombinaison) effectué sur la région 1 (2).

La première recombinaison correspond à l'insertion d'un plasmide pseudo-suicide dans le génome. Ce plasmide est construit par clonage portant notamment deux séquences homologues, adjacentes d'un gène ou d'une séquence d'intérêt du génome de *C. difficile* et une cassette de résistance à un antibiotique permettant son maintien dans les bactéries l'ayant intégré. Ce plasmide retarde la croissance lorsqu'il n'est pas intégré au génome d'où le terme de pseudo-suicide. Ainsi, la réalisation de la première recombinaison aboutit à l'observation de deux types de colonies : des « grosses » qui auront reçu le plasmide et qui auront réalisé la première recombinaison et des « petites » qui portent le plasmide non intégré au génome. Il existe deux possibilités d'insertion du plasmide dans l'ADN selon la zone d'homologie où a lieu cette première recombinaison. Dans les deux cas, cela aboutit à la duplication des deux séquences d'homologie et à l'insertion de la séquence mutée choisie dans l'ADN cible. On obtient ainsi des clones intermédiaires.

Après plusieurs étapes de repiquage des clones intermédiaires, la sélection de la seconde recombinaison est basée sur l'utilisation d'un marqueur de contre-sélection sur le plasmide

pseudo-suicide provoquant ainsi la mort cellulaire des clones n'ayant pas réalisé la seconde recombinaison. Cette recombinaison peut aussi se faire sur l'une ou l'autre des régions d'homologie avec deux possibilités : le retour à l'état sauvage si elle a eu lieu dans la même région ou la modification du génome (insertion/délétion) si elle a eu lieu dans l'autre région d'homologie.

Jusqu'à cette année, cette stratégie a permis de muter des gènes non essentiels de *C. difficile* permettant d'ouvrir le champ à de nombreuses études sur la fonction des gènes et leur implication dans le cycle infectieux de ce pathogène. Récemment, une version modifiée de cette technique mise au point dans notre laboratoire, a permis de réaliser des mutations létale-conditionnelles pour des gènes essentiels de *C. difficile* (Malet-Villemagne *et al.*, 2023) permettant ainsi de lever un nouveau verrou technique et offrant la perspective de nombreuses études.

D. Cycle de vie de *Clostridioides difficile*

C. difficile est présente sous deux formes : une forme sporulée métaboliquement dormante qui représente la forme de résistance, de dissémination et de transmission qui germe pour donner la forme végétative métaboliquement active et produisant les toxines.

1. Les spores de *Clostridioides difficile*

1.1. Caractéristiques

Les spores sont fortement résistantes à l'oxygène contrairement aux formes végétatives, à la température extrême, aux radiations, à la digestion enzymatique, à l'éthanol, aux agents oxydants (Setlow, 2014) et aux antibiotiques notamment la vancomycine (Baines *et al.*, 2009). Elles peuvent résister pendant une longue période et servir de réservoirs environnementaux à la bactérie (Swick *et al.*, 2016). Les spores constituent la forme transmissible de *C. difficile* et sont responsables de la réapparition de l'infection après l'arrêt du traitement (Lawley *et al.*, 2009; Vedantam *et al.*, 2012).

L'analyse par microscopie électronique à transmission des spores purifiées des souches de *C. difficile* a permis d'identifier la composition de sa structure multicouche qui lui confère cette résistance (Figure 5) (Lawley *et al.*, 2009).

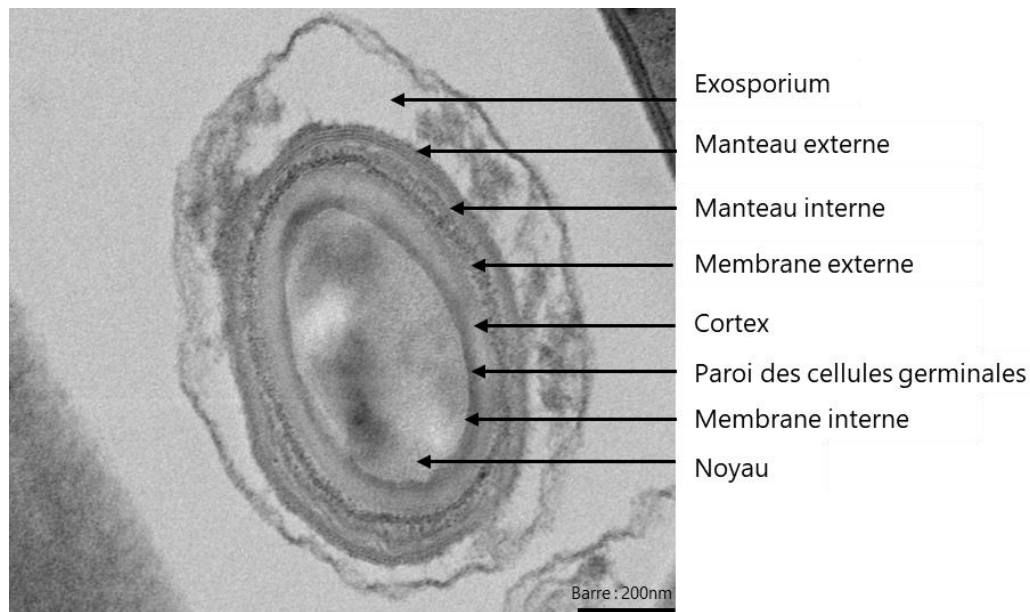


Figure 5 : Structure de la spore de la souche de référence 630 Δ erm de *C. difficile*, observation en microscopie électronique à transmission

Adaptée de (Coullon *et al.*, 2018).

De l'extérieur vers l'intérieur, on retrouve une structure lâche et flexible, variable en épaisseur et composée principalement de glycoprotéines appelée l'exosporium. Cette structure recouvre un manteau protéique dense avec une couche d'anneaux concentriques intérieurs. Juste après le manteau se trouve une membrane externe nécessaire à la formation de la spore et qui recouvre une couche épaisse composée de peptidoglycane appelée le cortex. Ce cortex recouvre une membrane qui deviendra la paroi bactérienne après la germination des spores. Cette membrane interne très peu perméable aux petites molécules recouvre un noyau dense déshydraté, riche en ribosomes et contenant plusieurs complexes nucléoprotéiques (Figure 5).

1.2. Sporulation

Le processus de sporulation serait initié lorsque les cellules végétatives de *C. difficile* rencontrent certains stimuli environnementaux tels que la limitation des nutriments, le *quorum sensing* (QS) et d'autres facteurs de stress (Higgins and Dworkin, 2012). Le QS est un mécanisme de communication cellule-cellule par lequel les bactéries coordonnent les informations relatives à leur densité cellulaire et régulent par conséquent l'expression de leurs gènes par la production, la détection et à la réponse à des molécules de signalisation extracellulaires (Darkoh *et al.*, 2015).

Lors de la sporulation, une cellule végétative subit une division asymétrique créant ainsi un compartiment de la cellule mère et une préspore plus petite. Une copie du génome est transférée dans la spore naissante, et la préspore est alors engloutie par la cellule mère

conduisant à la formation d'une spore immature délimitée par deux membranes dans le cytoplasme de la cellule mère. La spore subit ensuite un processus de maturation pour devenir une spore mature et métaboliquement dormante, qui est libérée par la lyse de la cellule mère (Figure 6).

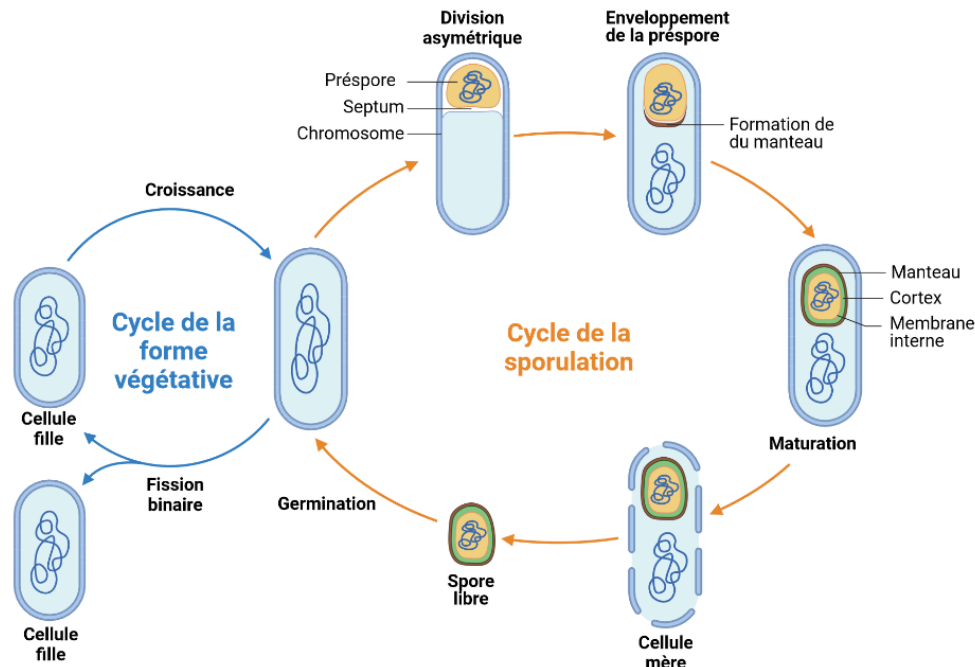


Figure 6 : Différentes étapes de la sporulation chez *C. difficile* (analogue des étapes trouvées chez *Bacillus subtilis*).

Adaptée de (McKenney *et al.*, 2013) et créée par BioRender.com.

Un grand nombre de facteurs impliqués dans la sporulation chez *Bacillus subtilis* pour lequel le mécanisme de sporulation est bien étudié sont conservés chez *C. difficile*. L'analyse protéomique et bio-informatique des spores de la souche de référence 630 de *C. difficile* a ainsi permis d'identifier une multitude de protéines homologues à des protéines retrouvées chez *B. subtilis* et qui seraient impliquées dans la sporulation (Lawley *et al.*, 2009). Cependant, la caractérisation des différentes fonctions de ces protéines chez *C. difficile* est toujours en cours d'étude.

Le régulateur principal de la sporulation chez *C. difficile* est Spo0A, une protéine conservée parmi la plupart des bactéries sporulantes (Fimlaid *et al.*, 2013). Deakin *et al.* ont montré dans un modèle murin que les souches *spo0A* sont capables d'induire l'infection avec une production importante de toxines de *C. difficile*. Néanmoins, ces souches ne persistent pas chez l'hôte et ne sont pas capables de transmettre le pathogène, suggérant le rôle important de Spo0A dans la persistance et la transmission de *C. difficile* (Deakin *et al.*, 2012). L'activation de Spo0A par phosphorylation se fait par les histidines kinases, dont CD1352, CD1492, CD1579,

CD1949, CD2492, qui permettent à Spo0A de réguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la sporulation (Pettit *et al.*, 2014).

De plus, plusieurs facteurs régulent l'expression de SpoA chez *C. difficile*. Par exemple, le régulateur RstA « *Regulator of Sporulation and Toxins* » régule sa phosphorylation (Edwards *et al.*, 2016b). En réponse à la disponibilité du glucose, CcpA « *Carbon Catabolite Protein A* » réprime directement l'expression de *spo0A* ainsi que des opérons *opp* et *sigF* qui codent pour les régulateurs de la phase précoce de la sporulation ou indirectement la transcription de *sinR* qui code des régulateurs qui stimulent la sporulation (Antunes *et al.*, 2012; A. Antunes *et al.*, 2011). De même, CodY « *Control of dipeptide transport operon* », un régulateur hautement conservé chez les Firmicutes, détecte la présence de GTP et des acides aminés à chaîne ramifiée et régule la transcription de *sinR* et de l'opéron *opp* (Dineen *et al.*, 2010, 2007; Nawrocki *et al.*, 2016). En outre, le facteur alternatif SigH, régulateur de la transition en phase stationnaire, régule positivement *spo0A* tandis que SigB réduit la transcription de l'histidine kinase CD1579 qui est impliquée dans la phosphorylation du Spo0A (Li and McClane, 2006; Sonenshein, 2000).

Ainsi, la sporulation des cellules végétatives de *C. difficile* est régulée par plusieurs facteurs, conduisant à la formation de spores, des formes de résistance et de dissémination essentielles pour la survie et la transmission de la bactérie.

1.3. Germination

Le processus de germination représente une étape cruciale dans la physiopathologie des ICD. En effet, les spores de *C. difficile* ingérées par voie orale suite à une contamination à partir de l'environnement vont résister à l'acidité gastrique, passer la barrière gastrique et atteindre l'intestin grêle pour germer. Cette germination conduit à la perte de la couche protectrice externe des spores pour ainsi redonner les cellules végétatives, métaboliquement actives.

La germination chez *C. difficile* est favorisée sous l'action de certains acides biliaires primaires en particulier ceux dérivés de l'acide cholique, notamment le taurocholate (Sorg and Sonenshein, 2008). L'acide chénodésoxycholique (CDCA), acide biliaire primaire agit quant à lui comme un inhibiteur de la germination médiée par le taurocholate (Sorg and Sonenshein, 2009). Il est important de noter que les acides biliaires seuls ne suffisent pas pour induire la germination. Des études ont montré qu'ils agissent en synergie avec les acides aminés comme la L-glycine ou la D-alanine ainsi que le calcium (Sorg and Sonenshein, 2008; Kochan *et al.*, 2017; Shrestha and Sorg, 2018). Le rôle des acides biliaires dans les ICD sera abordé en détail dans le chapitre dédié (Chapitre 3- le métabolisme des acides biliaires).

Les gènes impliqués dans la germination de *C. difficile* sont localisés sur le locus *cspBAC* qui code la sérine protéase CspBA et la pseudo-protéase CspC, caractérisés pour la première fois

chez *Clostridium perfringens*. La protéine CspBA obtenue sera clivée par YabG pour donner la pseudo-protéase CspA et la protéase CspB (Adams *et al.*, 2013; Kevorkian *et al.*, 2016).

Les co-germinants des spores de *C. difficile* sont reconnus par la pseudo-protéase CspC ce qui conduit à l'activation d'une cascade signal *via* CspB. L'activation de CspB provoque le clivage de la forme inactive de la protéine proSlec synthétisée pendant la phase précoce de la sporulation générant ainsi la forme active Slec nécessaire à la dégradation du cortex pendant la germination des spores (Paredes-Sabja *et al.*, 2009; Shimamoto *et al.*, 2001). La dégradation de ce cortex conduit à la libération de l'acide dipicolonique présent dans le cortex (CA-DPA qui a pour fonction de déshydrater le noyau et protéger l'ADN de la chaleur), l'hydratation du noyau, à la perte de la résistance des spores et enfin à la formation des formes végétatives.

CspA aurait un rôle dans l'entrée de CspC dans la spore mature et reconnaîtrait les co-germinants tout comme CspC suggérant une interaction entre les deux pseudo-protéases (Kevorkian *et al.*, 2016; Kevorkian and Shen, 2017).

Ainsi, les spores de *C. difficile* subissent le processus de germination sous l'action des co-germinants, qui sont reconnus par CspC et/ou CspA, ce qui transforme les spores en formes végétatives, colonisatrices de l'intestin.

2. La forme végétative de *Clostridioides difficile*

C. difficile est un bacille Gram positif anaérobie strict dont la forme végétative est incapable de survie prolongée en présence d'oxygène (Edwards *et al.*, 2016a). Sous sa forme végétative, *C. difficile* produit plusieurs facteurs de virulence qui sont associés à la survenue des infections à *C. difficile*. En effet, la physiopathologie des ICD comporte une étape importante de colonisation digestive à travers l'adhésion des cellules végétatives aux cellules épithéliales intestinales par le biais de ses composants de surface et une phase toxinique où la sécrétion des toxines A et B sera responsable des signes cliniques de l'infection.

2.1. Les facteurs de colonisation

Des études ont montré que *C. difficile* est capable d'adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin grêle et du colon chez l'Homme et au mucus recouvrant les cellules épithéliales chez les hamsters (Borriello *et al.*, 1988; Drudy *et al.*, 2001). *In vitro*, *C. difficile* adhère à une variété de lignées cellulaires dont les cellules Caco2 (cellules d'adénocarcinome colorectal humain), les cellules HT29 (adénocarcinome de l'épithélium colique humain), les cellules HeLa (cellules épithéliales du col utérin humaines) et les cellules Vero (cellules épithéliales de rein du singe vert africain) (Cerquetti *et al.*, 2002; Drudy *et al.*, 2001; Waligora *et al.*, 2001). L'adhésion de *C. difficile* est un mécanisme important pour l'établissement de l'infection puisque qu'il est

possible que *C. difficile* soit rapidement éliminé par les mécanismes de défenses de l'hôte sans avoir au préalable adhéré aux cellules épithéliales intestinales.

Plusieurs facteurs de *C. difficile* intervenant dans l'adhésion et colonisation aux cellules épithéliales de l'hôte ont été décrits dont les protéines de la paroi (Cwps « *Cell Wall Proteins* »). Une analyse structurale de la surface de la souche de référence de laboratoire 630 de *C. difficile* a décrit les protéines de la paroi de ce pathogène. Les gènes codant ces protéines sont localisés sur un locus de 36,6 kb, contenant 28 paralogues associés à la couche S et elles assurent différents rôles au niveau de la surface (Figure 7) (Fagan and Fairweather, 2014). Ces protéines comprennent généralement une séquence de peptide signal responsable de leur translocation depuis le cytoplasme et un domaine d'ancrage à la bactérie composé de trois domaines CWB2 « *Cell Wall Binding 2* » localisé soit sur la partie N-terminale, soit sur la partie C-terminale des protéines Cwps (Fagan *et al.*, 2011).

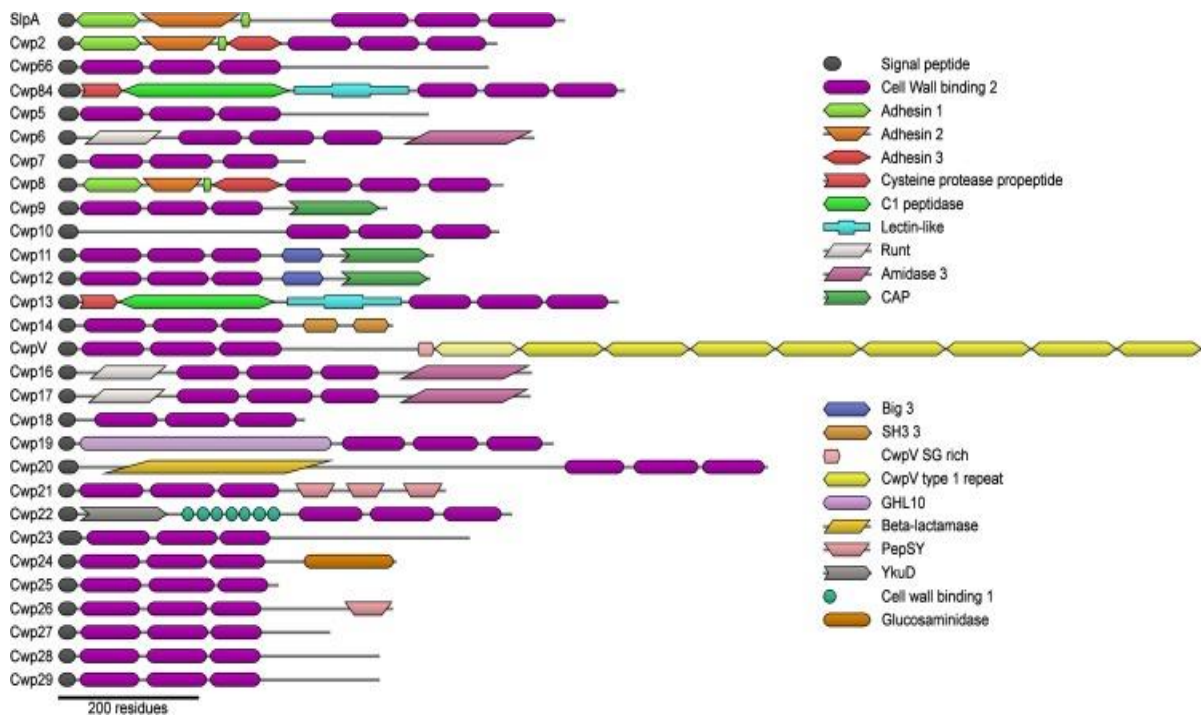


Figure 7 : Représentation de 29 protéines de surface Cwps de la souche 630 de *C. difficile*.

Chaque protéine présente en noir le peptide signal et en violet le domaine commun CWB2 situé soit en N-terminal ou soit en C-terminal. Dans la légende sont annotées les différentes fonctions prédites pour les Cwps.

D'après (Bradshaw *et al.*, 2018).

En plus de la couche S, on retrouve parmi les Cwps d'autres protéines qui participent de façon directe ou indirecte dans la colonisation comme les adhésines Cwp66 et CwpV, les protéases

Cwp84 et Cwp13, l'amidase Cwp6, l'autolysine Cwp19 et d'autres Cwps pour lesquelles leur rôle dans l'adhésion reste à caractériser (Figure 7) (Bradshaw *et al.*, 2018).

Outre les Cwps, plusieurs autres protéines de la paroi bactérienne sont impliquées dans la colonisation par *C. difficile*. On retrouve les protéines impliquées dans l'adhésion dont les *pili* de type IV, la protéine chaperonne GroEL de la famille des protéines Hsp « *Heat shock proteins* », la protéine de liaison à la fibronectine Fbp, la lipoprotéine CD0873 et les protéines flagellaires FliC et FliD qui sont également impliquées dans l'adhésion mais aussi dans la mobilité de *C. difficile* dans le tube digestif.

Les protéines de la couche S et les protéines flagellaires seront détaillées dans les parties dédiées puisque ce sont les deux facteurs étudiés dans cette thèse (voir partie réponse immune).

2.1.1. Protéines de la couche S

La couche S de *C. difficile* ou « *S-layer* », est une structure protectrice essentielle à *C. difficile*. Celle-ci représente une importante interface entre la bactérie et la cellule hôte. Elle joue un rôle important dans la virulence et la survie de la bactérie dans l'environnement.

Structure de la couche S

La couche S est une structure possédant un réseau cristallin ou paracristallin associée à la surface et retrouvée chez de nombreux procaryotes tels que *Bacillus anthracis*, *Campylobacter spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Paenibacillus alvei*, *Geobacillus stearothermophilus* mais aussi *C. difficile* (Sára and Sleytr, 2000). La couche S des souches de *C. difficile*, qu'il s'agisse de souches toxigènes ou non toxigènes, est composée de deux sous-unités protéiques dérivées du précurseur commun SlpA « *S-layer protein A* » codé par le gène *slpA* : la sous-unité LMW « *Low Molecular Weight* » (32 - 38 kDa) dérivée de la région N-terminale de SlpA et la sous-unité HMW « *High Molecular Weight* » (42 - 48 kDa) dérivée de la région C-terminale de SlpA (Figure 8A) (Cerquetti *et al.*, 2000).

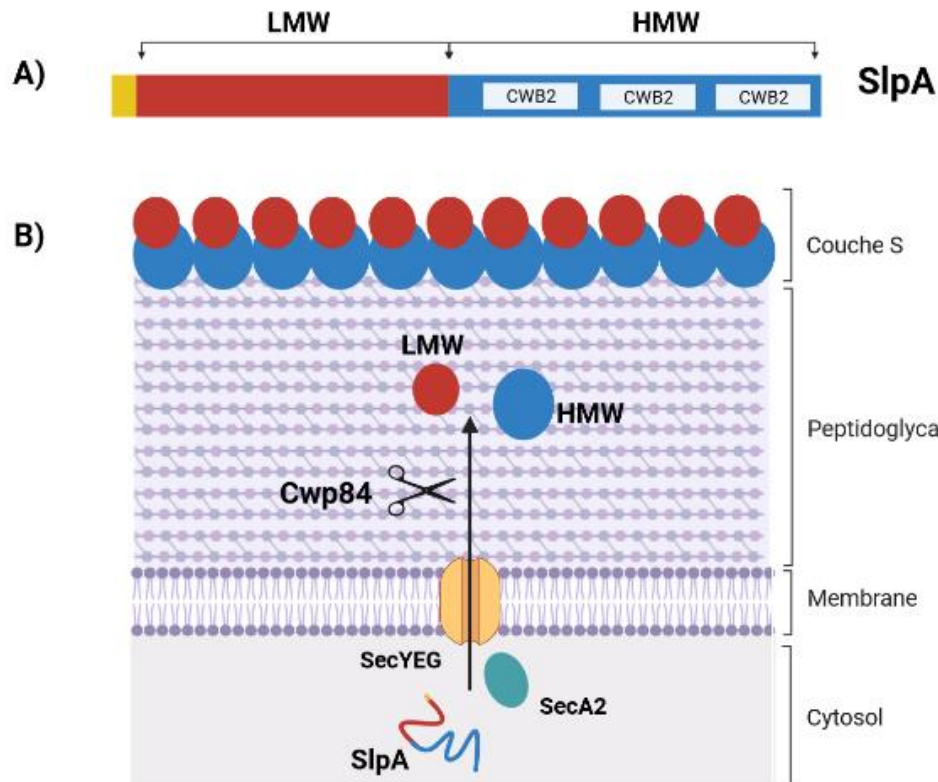


Figure 8 : Représentation du précurseur de la couche S, SlpA et de sa voie de sécrétion.

A) Architecture de SlpA et de ses différents domaines. En jaune le peptide signal, en rouge la sous-unité LMW, en bleu la sous-unité HMW avec ses trois motifs CWB2.

B) Sécrétion et maturation de SlpA. SlpA est reconnue dans le cytosol et transloquée à travers la membrane par le système SecA2/SecYEG. SlpA est ensuite clivée par Cwp84 pour générer les sous-unités LMW et HMW qui vont ensuite s'assembler et former le complexe LMW/HMW à la surface de la bactérie.

Adaptée de (Oatley *et al.*, 2020) et créée avec BioRender.com

Sécrétion et maturation de SlpA

Le précurseur SlpA est une pré-protéine qui subit un premier clivage du peptide signal responsable de la translocation de SlpA depuis le cytoplasme à la membrane cellulaire par le système de sécrétion SecYEG/SecA2. Après quoi, SlpA subit un deuxième clivage post-traductionnel par la cystéine protéase Cwp84 (Calabi *et al.*, 2001; Karjalainen *et al.*, 2002). Une fois clivées, les sous-unités LMW et HMW s'autoassemblent de façon non covalente pour former un hétérodimère LMW/HMW (*LMW/HMW complex*) qui forme la couche S à la surface de la bactérie (Figure 8B) (Fagan *et al.*, 2009; Mori and Takahashi, 2018). SlpA est extrêmement abondante et représente un coût métabolique important pour *C. difficile* (Kirk *et al.*, 2017a). La sous-unité LMW est localisée à la surface externe de la bactérie et présente une forte variabilité entre les souches de plusieurs ribotypes étudiés (Karjalainen *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2005) avec cependant un motif relativement conservé en C-terminal. Cette variabilité de la sous-unité

LMW serait une stratégie de la bactérie pour échapper aux cellules immunitaires de l'hôte. La sous-unité HMW est quant à elle ancrée au polysaccharide II (PSII) de la paroi via les motifs de liaison CWB2 et est hautement conservée parmi les souches de *C. difficile* (Cerquetti *et al.*, 2000; Fagan *et al.*, 2009; Takeoka *et al.*, 1991).

Rôle de SlpA dans la colonisation par *Clostridioides difficile*

Différents rôles ont été proposés pour la couche S bactérienne, notamment le maintien de l'intégrité structurelle de la bactérie, un rôle de tamis moléculaire, un facteur de virulence ou encore d'adhésion aux protéines extracellulaires (Calabi *et al.*, 2002; Sára and Sleytr, 2000).

En 2002, Calabi *et al.*, en utilisant une solution purifiée de protéines de SlpA, ont obtenu une liaison forte et spécifique de SlpA aux tissus gastro-intestinaux humains et de souris avec une liaison plus forte à la surface des cellules épithéliales de la lumière intestinale. Cette liaison dépend principalement de la sous-unité HMW de SlpA et lorsqu'on ajoute des anticorps anti-HMW, l'adhésion de *C. difficile* aux cellules HEp-2 est partiellement bloquée (Calabi *et al.*, 2002). Par ailleurs, Merrigan *et al.* ont montré une adhésion de la couche S de plusieurs souches de *C. difficile* aux cellules épithéliales intestinales de l'hôte. Le pré-traitement des cellules coliques humaines avec des solutions purifiées ou non des sous-unités LMW et HMW avec un anticorps anti-SlpA a entraîné une réduction significative de la liaison de la souche de *C. difficile* de référence 630 et de la souche épidémique de PCR ribotype 027 (Merrigan *et al.*, 2013).

Des études ont montré que la couche S est essentielle à la survie de *C. difficile*. En effet, il est difficile de muter le gène *slpA* dans les souches de *C. difficile*. Cependant, deux mutants avec des mutations ponctuelles dans le gène *slpA* (FM2.5 et FM2.6) ont été isolés dans la souche épidémique R20291. Ces mutants sont déficients dans la production de la couche S (Kirk *et al.*, 2017b). Les auteurs ont montré une forte diminution de la virulence du mutant FM2.5 déficient pour la couche S dans un modèle d'infection chez le hamster par rapport à la souche sauvage R20291. De plus, la production des toxines était fortement réduite dans le mutant FM2.5. (Kirk *et al.*, 2017b). Récemment, en utilisant deux variants du mutant FM2.5 (FM2.5_{varA} et FM2.5_{varB}), Ormsby *et al.* ont confirmé que la couche S intacte contribue fortement à la sévérité de l'infection. La présence de la couche S à la surface de la bactérie serait donc essentielle à la virulence de *C. difficile* (Ormsby *et al.*, 2023).

Outre son rôle dans la colonisation à travers l'adhésion aux cellules épithéliales et contribution à la virulence de *C. difficile*, SlpA active également les éléments de la réponse immune innée et adaptative. Cette partie sera détaillée dans le chapitre 3 - *réponse immune*. Par conséquent, SlpA représente un bon candidat comme cible thérapeutique, et pourrait être utilisée pour le développement d'un nouveau vaccin contre *C. difficile*.

2.1.2. Les protéines flagellaires FliC et FliD

Pour la plupart des pathogènes gastro-intestinaux, notamment *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* et *Helicobacter pylori*, la motilité médiée par les flagelles est reconnue comme un facteur de virulence essentiel rendant le pathogène plus apte à se déplacer depuis le site de colonisation (Richardson, 1991; Yao *et al.*, 1994; Eaton *et al.*, 1992; Silva and Benitez, 2006). De même, les flagelles de *C. difficile* lui confèrent la mobilité et jouent également un rôle majeur dans son adhésion aux cellules intestinales de l'hôte dans le processus de colonisation mais aussi dans le processus physiopathologique conduisant à l'infection.

Structure et assemblage des protéines flagellaires

Parmi les souches toxigènes de *C. difficile*, on retrouve les souches monotriches (un seul flagelle) comme la souche épidémiologique R20291, les souches péritriches (plusieurs flagelles) comme la souche de référence 630 (Figure 9) et les souches non flagellées comme les souches du PCR ribotype 078 (Baban *et al.*, 2013).

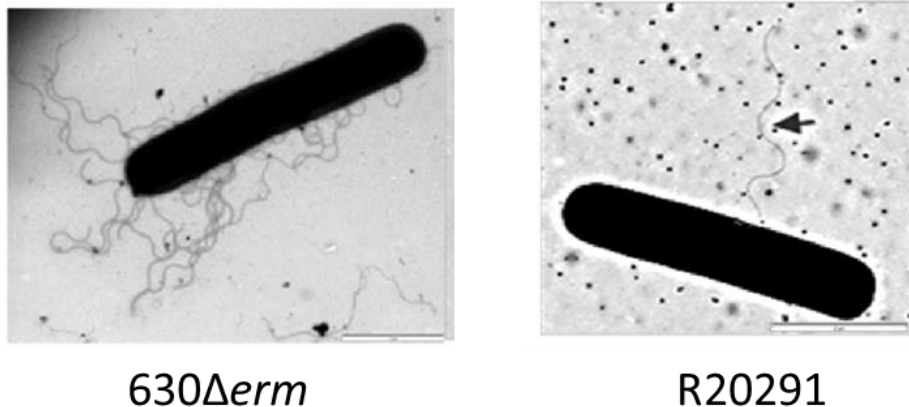
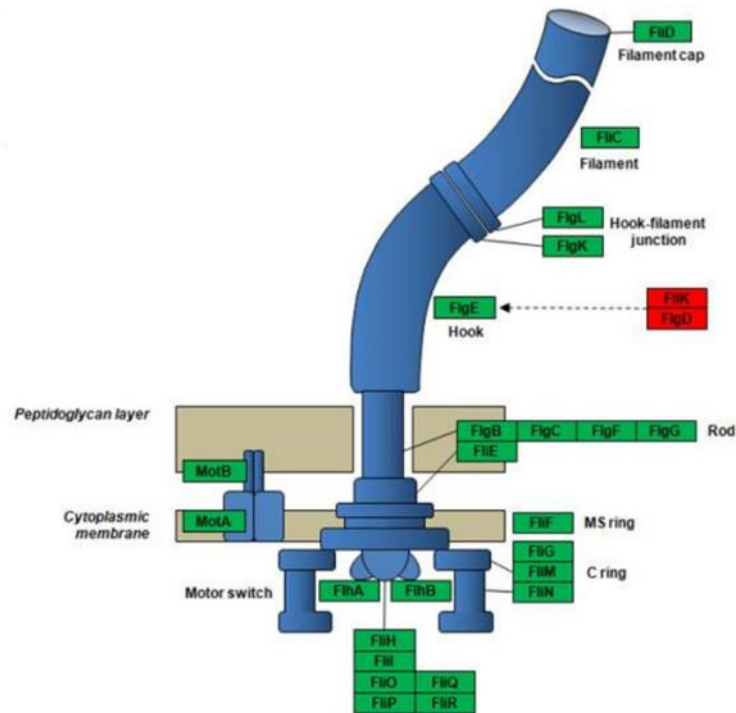


Figure 9 : Le flagelle de *C. difficile*

Observation en microscopie électronique à transmission des flagelles des souches 630 Δ erm (péritriche) et R20291 (monotriche).

Ces images sont issues de (Baban *et al.*, 2013).

A)



B)

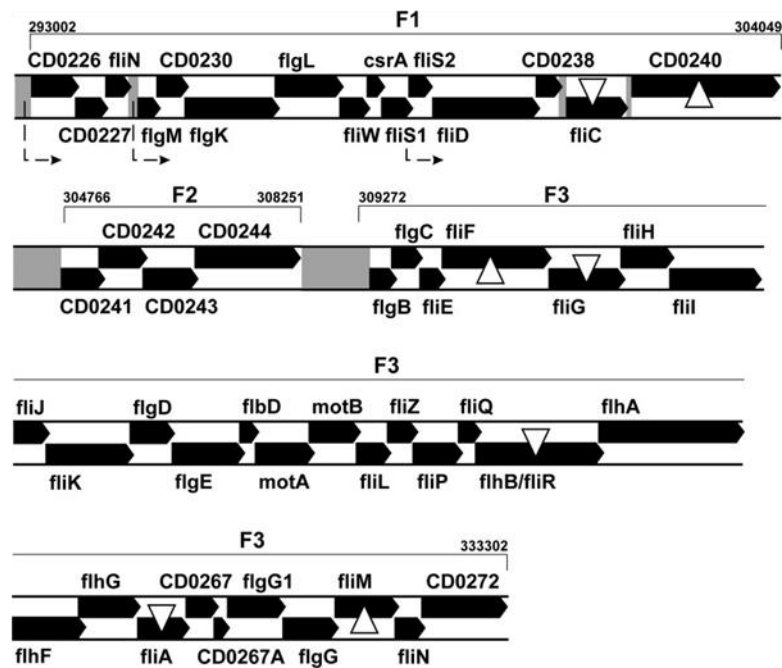


Figure 10 : Représentation de la structure d'un flagelle bactérien

A) représentation de la structure d'un flagelle d'une bactérie Gram positive avec un moteur moléculaire, un corps basal et un filament hélicoïdal s'apparentant au système de sécrétion de type III. D'après (Chan *et al.*, 2011).

B) Organisation des opérons distincts F1, F2 et F3 de la souche 630 de *C. difficile*. D'après (Aubry *et al.*, 2012).

Tout comme les autres bactéries flagellées, le flagelle de *C. difficile* est composé de trois éléments distincts (Figure 10A) : un moteur moléculaire, un corps basal et un filament hélicoïdal s'apparentant au système de sécrétion de type III (Duan *et al.*, 2013). Les gènes impliqués dans l'assemblage des flagelles de la souche de référence 630 de *C. difficile* sont organisés en trois opérons distincts F1, F2 et F3 (Figure 10B) (Stabler *et al.*, 2009). De façon hiérarchique, la transcription des gènes des flagelles de *C. difficile* débiterait par les gènes localisés dans la région F3 contenant le gène *fliA* qui code la protéine FliA, appelée aussi SigD. FliA ou SigD est impliquée dans la régulation des gènes tardifs de l'assemblage du flagelle notamment les gènes de l'opéron F1 (Aubry *et al.*, 2012; Meouche *et al.*, 2013) dont le gène *fliC* qui code la flagelline FliC (39 kDa) (Tasteyre *et al.*, 2000) et *fliD* qui code la protéine de la coiffe flagellaire FliD (56 kDa) (Tasteyre *et al.*, 2001b), les principales protéines du flagelle de *C. difficile*.

La région F2 est inter-flagellaire, variable selon les souches et code les gènes de glycanes impliqués dans glycosylation des flagelles qui est important pour l'assemblage et la motilité de *C. difficile* (Twine *et al.*, 2009).

Rôle des protéines flagellaires dans la colonisation par *Clostridioides difficile*

Plusieurs études ont montré dans des modèles d'infection chez la souris et le hamster, le rôle des flagelles dans la colonisation grâce à l'adhésion et à la motilité contribuant ainsi à la virulence de *C. difficile*

Une étude *in vitro* réalisée par Tasteyre *et al.* a montré que les protéines recombinantes FliC et FliD ainsi qu'une préparation brute d'extraits flagellaires sont capables d'adhérer aux cellules du caecum. Par ailleurs, ils ont montré *in vivo* que la souche de *C. difficile* ATCC 43593 non toxigène mais flagellée et mobile (ToxA-B-, Fla+) est 10 fois plus adhérente au caecum de souris axéniques que la souche non flagellée EX560 (ToxA-B-, Fla-) provenant du même séro groupe B. Néanmoins, aucune différence n'a été observée en terme de taux de colonisation digestive pour les deux souches (Tasteyre *et al.*, 2001a).

Par ailleurs, Dingle *et al.* ont montré que les mutants isogéniques de la souche 630 Δ *erm* de *C. difficile* pour les gènes *fliC* et *fliD* ont entraîné une perte des flagelles ainsi que de sa motilité. Néanmoins, cette souche était plus adhérente aux cellules Caco2 comparativement à la souche sauvage 630 Δ *erm*. De plus, la souche mutée a montré une virulence plus importante par rapport à la souche sauvage dans un modèle d'infection chez le hamster, suggérant que les flagelles ne semblent pas essentiels à l'adhésion de la souche sauvage 630 Δ *erm* *C. difficile* (T. C. Dingle *et al.*, 2011).

De même, Baban *et al.* ont obtenu une adhésion plus importante avec la souche 630 Δ *erm* de *C. difficile* pour laquelle les gènes *fliC* et *fliD* ont été mutés comparativement à la souche sauvage. Le rôle du flagelle dans l'adhésion semble aussi être souche dépendante. Lorsque les

auteurs ont comparé l'adhésion de la souche 630 Δ *erm* délétée des gènes *fliC* et *fliD* et de la souche R20291, ils ont observé une différence importante. En effet, les mutants *fliC* (R20291-*fliC*430s::CT) et *fliD* (R20291-*fliD*121s::CT) dans la souche R20291 ont montré une adhésion significativement plus faible aux cellules Caco2 comparativement aux souches sauvages. Enfin, dans un modèle de souris dixénique le mutant *fliC* de la souche R20291 a montré une colonisation plus faible par rapport à la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que les flagelles jouent un rôle dans la colonisation et l'adhésion par la souche R20291 contrairement à la souche 630 Δ *erm* (Baban *et al.*, 2013). Selon certaines études, la différence observée entre les souches serait due à des différences de glycosylation des flagelles qui leur confère une stabilité accrue, leur permettant des interactions cellule-cellule et provoquerait une réponse de l'hôte (Faulds-Pain *et al.*, 2014; Merino and Tomás, 2014; Twine *et al.*, 2009).

Le rôle de FliC a également été montré dans la formation du biofilm (Dapa *et al.*, 2013) et l'induction d'une réponse immune innée et adaptative (Batah *et al.*, 2017, 2016; Péchiné *et al.*, 2005a). Le rôle de FliC dans la mise en place de la réponse immune sera détaillé dans le chapitre 3 - *réponse immune*.

Ces données montrent que l'expression des flagelles est importante dans la virulence et la persistance de *C. difficile* bien qu'elle soit souche dépendante.

2.2. Les toxines de *Clostridioides difficile*

Il existe des souches de *C. difficile* naturellement productrices de toxines (souches toxigènes) ou non (souches non-toxigènes). Bien que plusieurs facteurs de pathogénicité soient associés à l'adhésion et à la colonisation par *C. difficile* (toxigène ou non), les symptômes des ICD sont associés à l'action des deux entérotoxines A (TcdA) et B (TcdB) (Voth and Ballard, 2005).

2.2.1. La toxine A (TcdA) et la toxine B (TcdB)

Le locus de pathogénicité (PaLoc)

TcdA et TcdB sont respectivement codées par les gènes *tcdA* et *tcdB* localisés sur un locus de pathogénicité (PaLoc) de 19,6kb (Figure 11) conservé chez les souches toxigènes de *C. difficile* (Braun *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 2000; Hammond and Johnson, 1995).

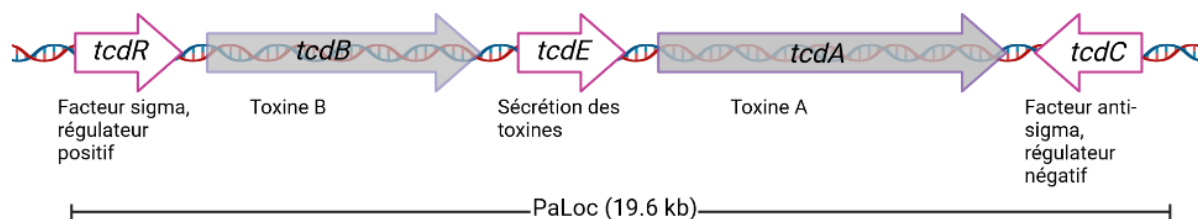


Figure 11 : Représentation du PaLoc de *C. difficile*.

Adaptée de (Buddle and Fagan, 2022) et créée avec BioRender.com

Concernant les souches non toxigènes, le PaLoc est remplacé par une séquence non codante de 75 à 115 nucléotides ou par une séquence de 7,2 kb dont la fonction reste à caractériser (Braun *et al.*, 1996; K. E. Dingle *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2009; Monot *et al.*, 2015). Ces souches peuvent cependant acquérir le PaLoc à partir des souches toxigènes par un transfert horizontal de gènes et ainsi devenir des souches productrices de toxines (Brouwer *et al.*, 2013).

Outre les gènes *tcdA* et *tcdB*, le PaLoc contient également trois gènes additionnels *tcdC*, *tcdE* et *tcdR* qui participent à la régulation et à la sécrétion de TcdA et TcdB (Figure 11).

Régulation de l'expression des toxines par les gènes présents sur le PaLoc

Le mécanisme par lequel ces gènes additionnels régulent la synthèse des toxines reste peu caractérisé. Toutefois, Mani et Dupuy ont montré en 2001 que le gène *tcdR* (anciennement dénommé *tcdD* ou *txeR*) code la protéine TcdR qui est un facteur sigma alternatif de l'ARN polymérase régulant positivement l'expression des toxines (Figure 12) (Mani and Dupuy, 2001). Il a été montré que TcdR est capable de se lier aux régions des promoteurs de *tcdA* et *tcdB* et ainsi favoriser l'activation de la transcription des gènes des toxines *in vitro*. TcdR régule également sa propre expression (Mani *et al.*, 2002).

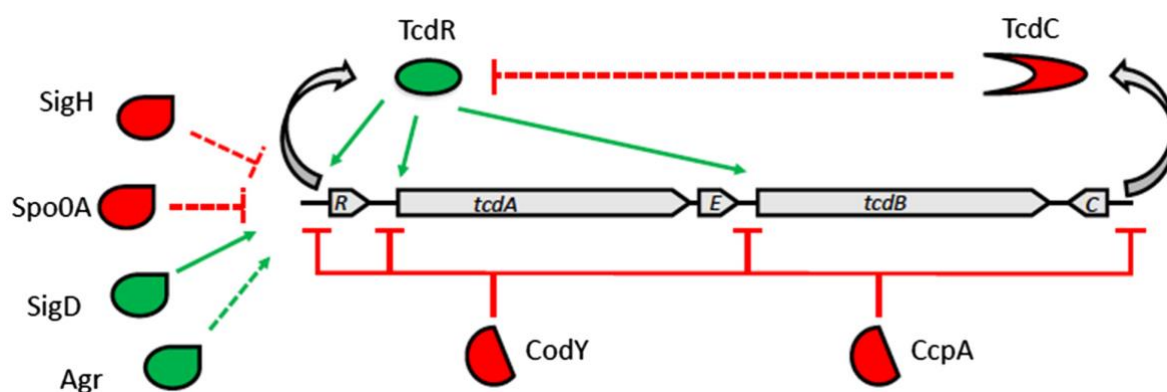


Figure 12 : Représentation de la régulation de l'expression des toxines.

La régulation positive est représentée en vert et la régulation négative en rouge. En pointillé, les régulations indirectes et en trait plein les régulations directes.

D'après (Ransom *et al.*, 2018).

L'expression des toxines semble être bimodale. En effet, Ransom *et al.* ont utilisé un gène rapporteur RFP « *Red Fluorescent Protein* » et ont montré qu'en phase stationnaire, les cellules de *C. difficile* se divisent en deux groupes pour produire TcdA (Ransom *et al.*, 2018). Un groupe TcdA-ON qui sécrète la toxine et un groupe TcdA-OFF qui ne sécrète pas TcdA. De plus, l'expression bimodale est présente dans plusieurs ribotypes de *C. difficile* mais elle semble être souche dépendante. Dans la souche hypervirulente R20291, seuls 30% des cellules sont TcdA-ON comparativement à la souche 630 Δ *erm* qui présente environ 80% de cellules TcdA-ON. Par ailleurs, *tcdR* serait le régulateur principal de l'expression bimodale des toxines (Ransom *et al.*, 2018).

Le gène *tcdC* code la protéine TcdC et est fortement exprimé pendant la phase exponentielle de croissance de la bactérie mais l'expression est interrompue lorsque les cellules entrent en phase stationnaire (Hundsberger *et al.*, 1997; Govind *et al.*, 2006) (Figure 12). Cette interruption serait due à la sécrétion de TcdA et TcdB. Contrairement à TcdR, TcdC régule négativement l'expression de *tcdA* et *tcdB* *in vivo* et *in vitro* (Matamouros *et al.*, 2007; van Leeuwen *et al.*, 2013). D'après une étude réalisée par Matamouros *et al.*, TcdC serait un facteur anti-sigma impliqué dans la modulation de l'expression des toxines à travers la séquestration de TcdR (Matamouros *et al.*, 2007).

Enfin, le gène *tcdE* code la protéine TcdE et présente des séquences et des caractéristiques structurales similaires à celles des protéines holines qui sont des protéines cytolitiques des bactériophages (Tan *et al.*, 2001). Ceci suggère que TcdE régulerait la sécrétion des toxines (Figure 12). Bien que la fonction de TcdE n'ait pas été démontrée de manière concluante, Govind et Dupuy ont montré en 2012 que TcdE serait nécessaire pour la sécrétion efficace des toxines (Govind and Dupuy, 2012).

Régulation de l'expression des toxines en réponse aux stimuli environnementaux

L'expression des toxines est régulée par les *stimuli* environnementaux, notamment la disponibilité des nutriments et les changements de température (Bouillaut *et al.*, 2015; Dupuy and Sonenshein, 1998; Karlsson *et al.*, 2003; Yamakawa *et al.*, 1996). En effet, une température élevée au-delà de 37°C induit une diminution de la production des toxines (Karlsson *et al.*, 2003). Par ailleurs, la présence de nutriments notamment les acides aminés dont la proline, la cystéine ou encore l'acide glutamique et la biotine vont inhiber l'expression des toxines là où les acides gras à chaîne courte vont la stimuler (Dupuy and Sonenshein, 1998; Karasawa *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 2000, 1999). Au laboratoire, la synthèse des toxines augmente lorsque les bactéries entrent dans la phase stationnaire ou en processus de sporulation (Dupuy and Sonenshein, 1998; Hundberger *et al.*, 1997).

En réponse aux *stimuli* environnementaux et à la disponibilité des nutriments, plusieurs régulateurs en dehors du PaLoc comme CodY et CcpA, Spo0A, SigH, RstA participent directement ou indirectement à la régulation de l'expression des toxines (Figure 12).

CodY se lie aux promoteurs des gènes *tcdA*, *tcdB*, *tcdC* et *tcdR* avec une forte affinité pour le promoteur de *tcdR* et agit comme un répresseur de l'expression des toxines. (Dineen *et al.*, 2007, 2010). L'interaction de CodY et *tcdR* est influencée par la présence des cofacteurs dont les acides aminés à chaîne ramifiée et le GTP lorsque les cellules alors sont en phase exponentielle. En condition de limitation de nutriments dans le milieu, CodY ne se lie plus aux cofacteurs (Dineen *et al.*, 2007).

En présence de glucose, tout comme CodY, le répresseur CcpA se lie aux promoteurs de *tcdA*, *tcdB*, *tcdC* et *tcdR* avec une forte affinité pour le promoteur de *tcdR* (A. Antunes *et al.*, 2011).

Les régulateurs de la sporulation Spo0A et SigH inhibent l'expression des toxines en réprimant l'expression de *tcdR*. L'effet de Spo0A semble être souche dépendante. En effet, SpoA inhibe l'expression des toxines dans les souches de PCR ribotype 027, mais l'effet sur celles de PCR ribotype 078 et sur la souche de référence 630 Δ *erm* de *C. difficile* reste négligeable (Mackin *et al.*, 2013; Rosenbusch *et al.*, 2012; Saujet *et al.*, 2011).

Il semble qu'il y'a un lien entre l'expression des flagelles et celle des toxines TcdA et TcdB. En effet, Dingle *et al.* ont montré que les mutants isogéniques *fliC* et *fliD* créés dans la souche 630 Δ *erm* ont une toxicité plus importante comparativement à celle de la souche sauvage lorsqu'ils sont exposés aux cellules Vero et dans un modèle d'infection chez le hamster (T. C. Dingle *et al.*, 2011). Ces résultats ont été confirmés par Aubry *et al.* qui ont montré, après l'analyse transcriptomique du PaLoc, que les gènes *tcdE*, *tcdR*, *tcdA* et *tcdB* sont hautement transcrits dans le mutant 630 Δ *erm* Δ *fliC*. Ce mutant produit plus de toxines TcdA et TcdB dans le surnageant que la souche sauvage (Aubry *et al.*, 2012).

Le lien entre les flagelles et les toxines semble dépendre du second messager bactérien c-di-GMP « *cyclic di-guanosyl-51 monophosphate* ». En effet, un taux élevé de c-di-GMP intracellulaire régule négativement l'expression des gènes du flagelle et des toxines (Purcell *et al.*, 2012). Le c-di-GMP, en réprimant l'expression des gènes du flagelle, réprime également l'expression des gènes des toxines à travers la répression du facteur sigma alternatif SigD de la région F3 des flagelles impliqué dans l'assemblage des flagelles (McKee *et al.*, 2013). Il a été montré que SigD, régule positivement l'expression des toxines par l'intermédiaire de *tcdR*. L'inactivation du gène *sigD* induit une forte diminution de l'expression des gènes *tcdA*, *tcdB* et *tcdR* de même que les gènes impliqués dans l'assemblage des flagelles (Meouche *et al.*, 2013).

Par ailleurs, le facteur RstA impliqué dans la régulation de la sporulation *C. difficile* inhibe l'expression des toxines en réprimant l'expression *tcdR* via SigD (Figure 12). L'expression serait

souche dépendante comme pour Spo0A (Edwards *et al.*, 2020). Outre sa liaison au promoteur de *tcdR*, RstA se lie directement aux promoteurs des toxines, induisant ainsi une forte régulation du système impliqué dans la production de TcdA et TcdB (Edwards *et al.*, 2019).

Outre SigD, le *quorum sensing* (mécanisme de communication cellule-cellule) régule positivement l'expression des toxines. Une mutation dans le locus *agr* responsable de la production des peptides auto-inducteurs du *quorum sensing* induit l'inhibition de l'expression des toxines (Darkoh *et al.*, 2015).

Dans l'ensemble, ces données montrent à quel point la régulation de l'expression des toxines est complexe et multifactorielle faisant intervenir différents facteurs environnementaux et d'autres facteurs produits par *C. difficile*.

Structure des toxines

TcdA et TcdB appartiennent à la famille des *Large Clostridial Glucosylating toxins* (LCTs) due à leur haut poids moléculaire (respectivement, 308 kDa et 270 kDa) tout comme les toxines létales (TcsL) et hémorragiques (TcsH) de *C. sordellii*, l' α -toxine de *C. novyi* (Tcn α) et la cytotoxine de *C. perfringens* (TpeL). Ces LCTs ont la capacité d'induire de forts changements dans la morphologie cellulaire (Orrell and Melnyk, 2021).

TcdA et TcdB présentent 63 % d'acides aminés identiques, suggérant que ces toxines pourraient être issues d'un événement de duplication de gènes (von Eichel-Streiber *et al.*, 1992). Ces toxines sont composées d'une structure à quatre domaines selon un modèle ABCD (A pour *biological Activity*, B pour *Binding*, C pour *Cutting* et D pour *Delivery*) (Figure 13a, Figure 14a) (Jank and Aktories, 2008). Le domaine A en N-terminal est biologiquement actif grâce à son activité de glycosyltransférase (GTD). Le domaine C quant à lui a une activité cystéine protéase (CPD) et est responsable du clivage autocatalytique de la toxine activant ainsi le domaine glycosyltransférase. Le domaine D (DRBD) est impliqué dans la translocation de la toxine dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. Enfin, le domaine B localisé en C-terminal est responsable de la liaison aux récepteurs sur les cellules épithéliales et est constitué de séquences répétées polypeptidiques nommées CROPs « *Combined Repetitive Oligopeptides* ». Des études ont montré que lorsque des anticorps sont dirigés contre les toxines, la liaison au récepteur et l'effet cytotoxique des toxines sont inhibés (Frey and Wilkins, 1992; Leuzzi *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent le rôle important du domaine de liaison aux récepteurs.

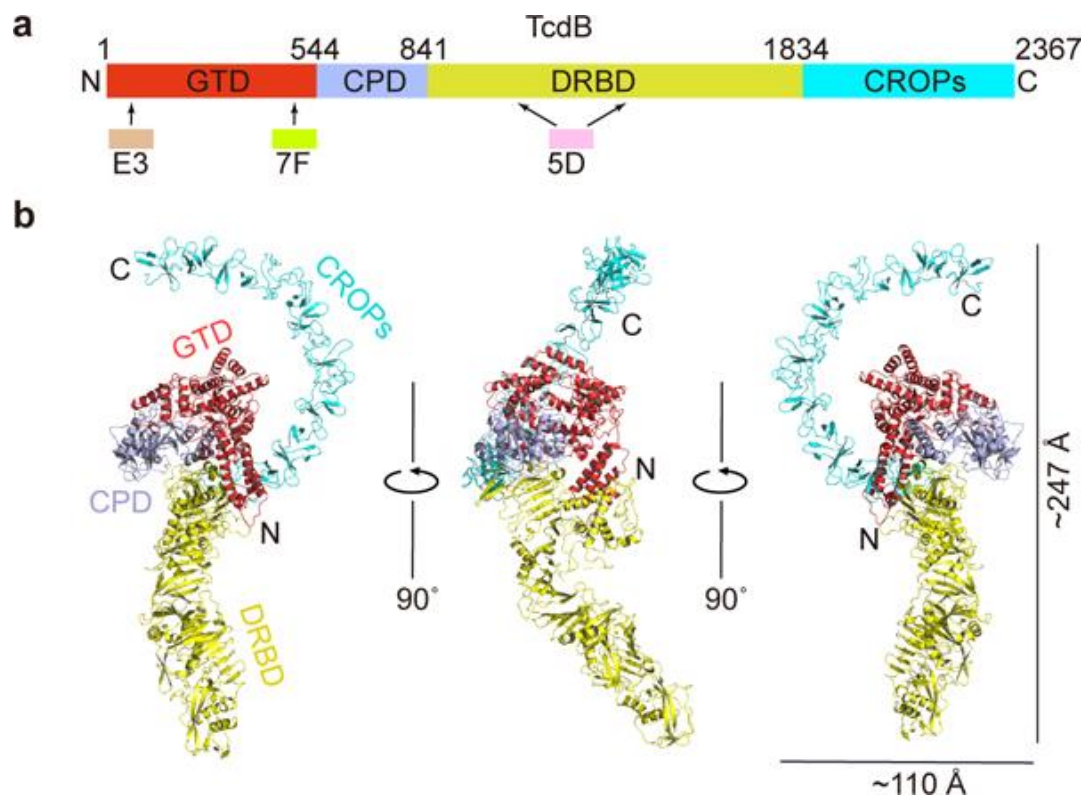


Figure 13 : Structure de la toxine B de *C. difficile*

a) représentation des domaines structuraux de TcdB. En rouge le domaine de translocation (GTD), en bleu clair le domaine cystéine protéase (CPD), en jaune le domaine de translocation (DRBD) et en bleu le domaine de liaison CROPs

b) structure cristalline de TcdB avec son domaine CROPs orienté vers le haut.
D'après (Chen *et al.*, 2019).

En 2019, Chen *et al.* ont réussi à analyser la structure cristalline complète de TcdB à une résolution de 3,87 Å dans sa conformation obtenue au pH endosomal (pH 5,2) (Chen *et al.*, 2019). La structure obtenue de TcdB (code PDB : 6OQ5) présente les domaines A, C, D comme décrits ci-dessus et un domaine B (CROPs) allongé et orienté vers le haut (Figure 13b), suggérant une évolution et l'étendue des conformations que peut prendre TcdB. Le domaine CROPs obtenu est composé de deux types de séquences répétées : vingt répétitions courtes (SR) composées de 20 à 23 résidus et quatre répétitions longues (LR) composées de 30 résidus conduisant à une structure du CROPs formée par quatre unités équivalentes (Figure 13).

De plus, l'analyse de la structure cristalline a montré une séquence SR en C-terminal du domaine de translocation D liée au domaine CROPs et qui interagit avec le domaine C. Cette séquence obtenue est nommée « *hinge-like region* ». La présence de cette structure suggère une interaction entre les quatre domaines. En effet, il a été montré qu'une délétion dans cette « *hinge-like region* » induit une forte réduction de l'activité cytotoxique de TcdB (Zhang *et al.*, 2013).

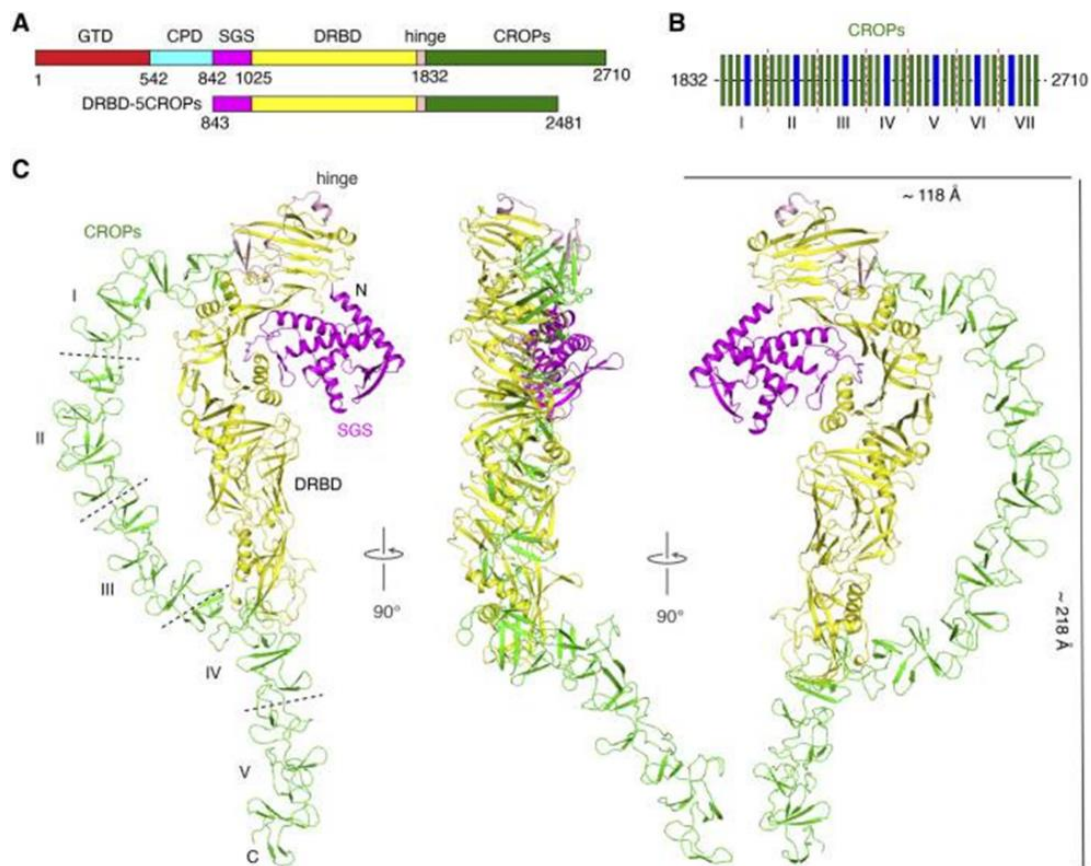


Figure 14 : Structure de la toxine A de *C. difficile*

- a)** représentation des domaines structuraux de TcdA. En rouge le domaine de translocation (GTD), en bleu le domaine protéasique (CPD), en violet le domaine SGS « *small globular subdomain* » (sa fonction n'est pas connue), en rose le « *Hinge-like region* », en jaune le domaine de translocation (DRBD) et en vert le domaine de liaison CROPs
- b)** le domaine CROPs contenant les sept unités
- c)** structure cristalline de TcdA avec son domaine CROPs orienté sur le côté.
D'après (Chen *et al.*, 2022).

Contrairement à TcdB, la structure cristalline complète de TcdA n'a pas encore été obtenue. Néanmoins, les domaines de TcdA ont été identifiés et ont permis de la modéliser (code PDB : 7U1Z, 4DMV, 7POG, 4RO4) (Figure 14c).

Bien que les domaines CROPs de TcdA et TcdB aient la même conformation, ils restent cependant variables entre les deux toxines en termes de séquences répétées et de disposition spatiale du CROPs (Chen *et al.*, 2022). Le domaine CROPs de TcdA est composé de sept unités contenant 32 SR et 7 LR (Figure 14b) (Ho *et al.*, 2005). De même que TcdB, le domaine « *hinge-like region* » est retrouvé entre les domaines de translocation et CROPs de TcdA, suggérant aussi son rôle important de l'interaction des différents domaines.

Ces études ont également montré que la modification conformationnelle des domaines CROPs de TcdA et TcdB en fonction du pH peut avoir des conséquences sur la modulation de leur activité en réponse aux stimuli environnementaux et cellulaires mais aussi sur la liaison aux récepteurs et la réponse aux diverses stratégies thérapeutiques (Chen *et al.*, 2019, 2022). Par conséquent, la connaissance de la structure cristalline des toxines est cruciale dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les récepteurs des toxines

TcdA et TcdB ont la même activité enzymatique (Just *et al.*, 1995) cependant, elles interagissent avec des récepteurs différents.

Les premières études quant à l'identification des récepteurs de TcdA ont suggéré que TcdA se lie aux glycanes via les domaines Gal- α -1,3-Gal- β -1,4-GlcNAc. Mais ces domaines ne sont pas exprimés au niveau de l'épithélium intestinal chez l'Homme (Krivan *et al.*, 1986; Teneberg *et al.*, 1996). Par ailleurs, une autre étude a montré que TcdA se liait aux antigènes glucidiques nommés X/Y/I de Lewis présents chez l'Homme (Tucker and Wilkins, 1991). TcdA semble également se lier à des glycoprotéines comme la glycoprotéine 96 (gp96) qui est une protéine de liaison de la membrane plasmique des colonocytes humain (Na *et al.*, 2008) et la sucrase-isomaltase (SI) exprimée chez le lapin mais pas chez l'Homme (Pothoulakis *et al.*, 1996). Récemment, Tao *et al.* ont utilisé une TcdA tronquée, dépourvue du domaine CROPs et ont identifié par criblage CRISPR-Cas9 de nouveaux récepteurs indépendants du domaine CROPs dont les glycosaminoglycanes sulfatés (sGAG) qui sont abondants dans l'épithélium colique et un récepteur endocytaire LDLR1 de la famille des «*Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein* » (LDLR) (Tao *et al.*, 2019).

Contrairement à TcdA qui semble se lier à des récepteurs glucidiques, plusieurs récepteurs ont été identifiés pour TcdB notamment le récepteur CSPG4 «*Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4* » hautement conservé et isolé à partir d'un criblage de la base de données shRNAmir sur le génome humain. CSPG4 est exprimé sur les myofibroblastes sous-épithéliaux humains et murins, mais pas à la surface de l'épithélium colique. Il n'est donc accessible qu'après la rupture de la barrière épithéliale suggérant que CSPG4 n'est pas le récepteur principal de TcdB (Yuan *et al.*, 2015).

Le récepteur PVRL3 «*Poliovirus Receptor Like 3* » de la famille des nectines est fortement exprimé à la surface des cellules épithéliales coliques humaines. PVRL3 est colocalisé avec TcdB dans les tissus de patients présentant des colites (LaFrance *et al.*, 2015).

Récemment, les récepteurs FZD1, FZD2, FZD7 «*Frizzled Proteins* » de la famille Wnt ont été identifiés comme des récepteurs importants de TcdB mais indépendants du domaine de liaison CROPs. Ils sont exprimés à la surface de l'épithélium colique, contrairement à CSPG4 (Tao *et al.*, 2016).

Mécanisme d'action des toxines A et B

En termes de mécanisme d'action (Figure 15), après liaison de la toxine aux récepteurs exprimés à la surface des cellules hôtes, celle-ci est internalisée par endocytose par la voie clathrine-dépendante (Papatheodorou *et al.*, 2010). L'acidification de l'endosome entraîne un changement conformationnel de la toxine dans le domaine CROPs ce qui va favoriser son insertion dans la membrane et la formation d'un pore (Barth *et al.*, 2001; Qa'Dan *et al.*, 2000).

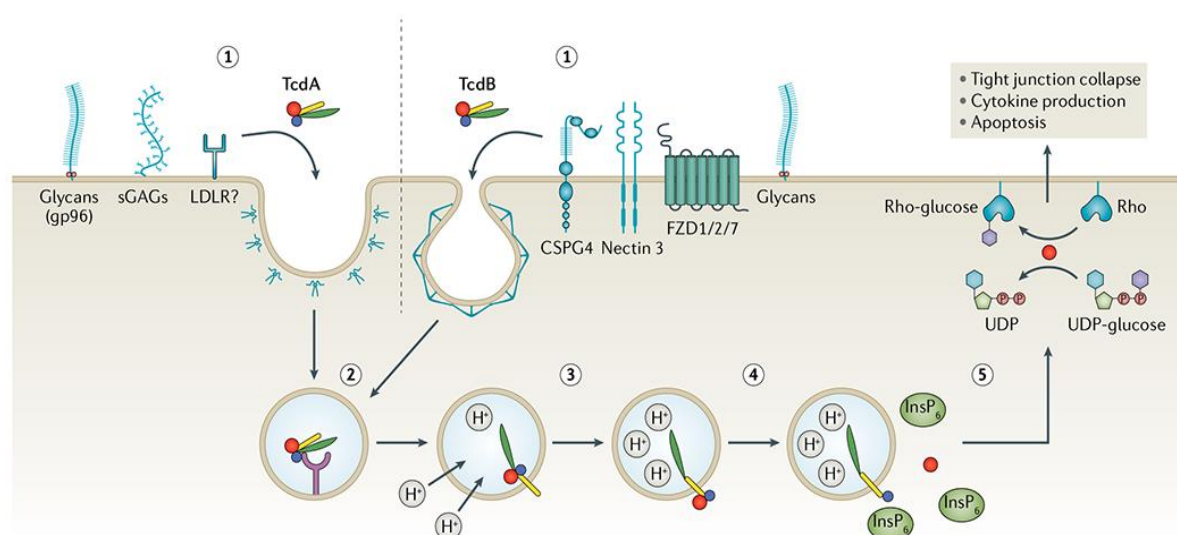


Figure 15 : Représentation du mécanisme d'action de TcdA et TcdB

Après liaison au récepteur, la toxine est internalisée et l'acidification dans l'endosome induit un changement de conformation de la toxine et la translocation des domaines cystéine protéase (CPD) et glycosyltransférase (GTD) de l'endosome vers le cytosol. Après libération du domaine GTD par clivage, celui-ci glycosyle les protéines GTPases et induit ainsi la dépolymérisation de l'actine et la mort cellulaire.

D'après (Kordus *et al.*, 2022).

La toxine est ensuite auto-clivée à la suite de l'activation du domaine C (CPD) et favorise la translocation du domaine glycosyltransférase de l'endosome au cytosol (Egerer *et al.*, 2009; Oezguen *et al.*, 2012). Dans le cytosol, le domaine glycosyltransférase est capable d'inactiver les membres de la famille Rho GTPase, y compris Rho, Rac et Cdc42, via le transfert de glucose de l'UDP-glucose à ces protéines au niveau d'un résidu thréonine conservé (Thr-37 pour Rho et Thr-35 pour Rac et Cdc42) (Jank *et al.*, 2007; Just *et al.*, 1995).

Cette glycosylation bloque l'actine G dans sa configuration inactive et empêche la reconnaissance des effecteurs qui sont en aval inhibant ainsi l'actine G de façon permanente. La dépolymérisation de l'actine va entraîner une perturbation du cytosquelette qui se traduit par l'arrondissement des cellules, l'altération des jonctions serrées conduisant à la mort cellulaire et à la perte de fonction de la barrière intestinale (Gerhard *et al.*, 2008; Janoir, 2016).

La perte de l'intégrité de l'épithélium intestinal va induire l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-8. Ce phénomène est associé à l'afflux des polynucléaires neutrophiles et va ainsi entraîner une réaction inflammatoire intense au niveau du colon responsable des manifestations cliniques de l'infection dont la colite pseudomembraneuse (Madan and Petri, 2012).

Contribution des toxines TcdA et TcdB dans la virulence de *C. difficile*

Les premières études sur la virulence de TcdA et TcdB dans les infections ont fait considérer pendant plusieurs années TcdA comme le facteur principal de la virulence de *C. difficile* malgré une activité enzymatique équivalente pour TcdB.

Lyerly *et al.* ont montré chez les hamsters infectés par voie intragastrique avec *C. difficile*, que TcdB à elle seule n'était pas en mesure d'induire l'infection à *C. difficile* chez les animaux. Ces résultats suggèrent que TcdA et TcdB agissent en synergie et que TcdB ne peut avoir un effet qu'après des lésions tissulaires causées par TcdA (Lyerly *et al.*, 1985).

Corthier *et al.* en 1991 ont immunisé des souris axéniques avec des anticorps monoclonaux anti-TcdA puis ils ont infecté ces souris par une souche toxigène de *C. difficile*. Les souris ayant reçu les anticorps ont survécu et avaient une quantité de TcdA significativement plus élevée en comparativement à celle de souris non immunisées. De plus, la quantité de TcdB détectée dans les selles était comparable à celles de souris non immunisées confirmant les résultats obtenus par Lyerly *et al.* indiquent que TcdA serait un facteur clé dans la survenue de la physiopathologie des ICD (Corthier *et al.*, 1991).

Cependant, l'émergence de nouvelles souches tronquées de TcdA (TcdA- TcdB+) capables de provoquer une ICD, avec parfois des colites pseudomembraneuses, a suscité des questions sur la virulence de TcdB dans les ICD (Kato *et al.*, 1998; Limaye *et al.*, 2000; Pituch *et al.*, 2001; Rupnik *et al.*, 2003).

En utilisant des souches mutantes exprimant l'une ou l'autre des toxines pour infecter des hamsters, Lyras *et al.* ont montré que la souche ne produisant que TcdB (A-B+) était plus virulente et a induit la mort des hamsters en comparaison de la souche produisant uniquement TcdA (A+B-) (Lyras *et al.*, 2009). Ces résultats contredisent les observations de Lyerly *et al.* et Corthier *et al.* sur l'effet de TcdB dans la virulence de *C. difficile*.

De même que Lyras *et al.*, Carter *et al.* ont montré que la souche TcdA+ TcdB- était moins virulente par rapport à la souche sauvage TcdA+ TcdB+, alors que les souches TcdA- TcdB+ ont présenté une virulence accrue (Carter *et al.*, 2015). Ces études suggèrent que TcdB semble nécessaire et suffisante pour causer l'infection et les symptômes chez la souris et le hamster. Chez l'Homme, seules les souches TcdA- TcdB+ sont isolées chez des patients avec une fréquence de 0,2 à 97% en fonction de leur origine et provoquant les mêmes symptômes que

les souches TcdA+ TcdB+ (Drudy *et al.*, 2007). Néanmoins, bien que moins fréquent, Monot *et al.* ont pu isoler en 2015, une souche TcdA+ TcdB- d'un patient infecté symptomatique (Monot *et al.*, 2015).

Il est évident que TcdB est un facteur important impliqué dans la virulence. Son rôle a été montré dès les premières études sur le rôle de ces toxines. De plus, les anticorps monoclonaux anti-toxine B de *C. difficile*, ont été retenus comme seule cible de la stratégie d'immunisation passive à l'issue de larges essais cliniques sur le bezlotoxumab (ZINPLAVA®) qui sera détaillé dans le chapitre 2 – traitement des ICD.

Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre le rôle respectif de TcdA et de TcdB dans la physiopathologie des ICD. Il semble donc important de considérer les deux toxines lors des développements des approches diagnostiques et thérapeutiques des ICD.

2.2.2. La toxine binaire de *Clostridioides difficile*

Outre TcdA et TcdB 5 à 30 % des souches de *C. difficile* produisent une troisième toxine appelée « *C. difficile* transferase » (CDT) ou toxine binaire. Cette toxine aurait un rôle expliquant la virulence accrue de certaines souches de *C. difficile* (Gerding *et al.*, 2014; Perelle *et al.*, 1997).

Structure de la toxine binaire

La toxine binaire est composée de deux protéines CDTa (48 kDa) et CDTb (99 kDa) et fait partie de la famille des toxines à activité ADP-ribosyltransférase. CDTa et CDTb sont respectivement codées par les gènes *cdtA* et *cdtB* localisés sur le locus CdtLoc (6,2 kb) (Figure 16). En plus des gènes *cdtA* et *cdtB*, le locus comprend un gène additionnel *cdtR* codant une protéine régulatrice CdtR, impliquée dans l'activation de la production de la toxine binaire (Carter *et al.*, 2007; Popoff and Boquet, 1988).

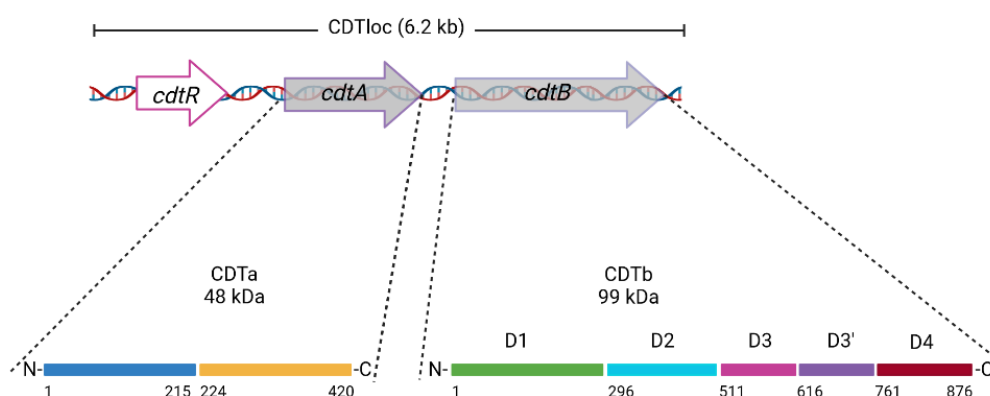


Figure 16 : Représentation du locus CDTloc et des composants de CDTa et CDTb
Adaptée de (Martínez-Meléndez *et al.*, 2022) et créée avec BioRender.com

CDTa correspond au domaine enzymatique possédant l'activité ADP-ribosyltransférase spécifique de l'actine et CDTb est impliquée dans la liaison aux récepteurs des cellules intestinales de l'hôte et la translocation du CDTa dans le cytosol (Gülke *et al.*, 2001).

La structure CDTa a deux domaines, un domaine N-terminal impliqué dans la liaison à CDTb et un domaine C-terminal responsable de l'ADP-ribosylation de l'actine.

La structure de liaison à CDTb, apparenté à l'antigène protecteur (PA) de la toxine de l'anthrax, est divisé en quatre domaines : un domaine I N-terminal d'activation, un domaine II impliqué dans l'insertion dans la membrane et la formation des pores, un domaine III qui participe à l'oligomérisation et le domaine C-terminal IV impliqué dans la liaison aux récepteurs (Barth *et al.*, 2004).

Mécanisme d'action de la toxine binaire

Contrairement à TcdA et TcdB, chaque composant est non-toxinogène par lui-même et l'activité toxique n'advient qu'après l'association des deux composants (Anderson *et al.*, 2020). Le mécanisme d'action de la toxine binaire (Figure 17) serait apparenté au mécanisme d'action des autres membres de la famille des ADP-ribosyltransférases et commence par la liaison de la structure CDTb par l'intermédiaire de son récepteur membranaire LSR « *Lipolysis-stimulated lipoprotein Receptor* » présent à la surface des cellules du foie, des reins, de l'intestin grêle et du colon de l'hôte (Papatheodorou *et al.*, 2011).

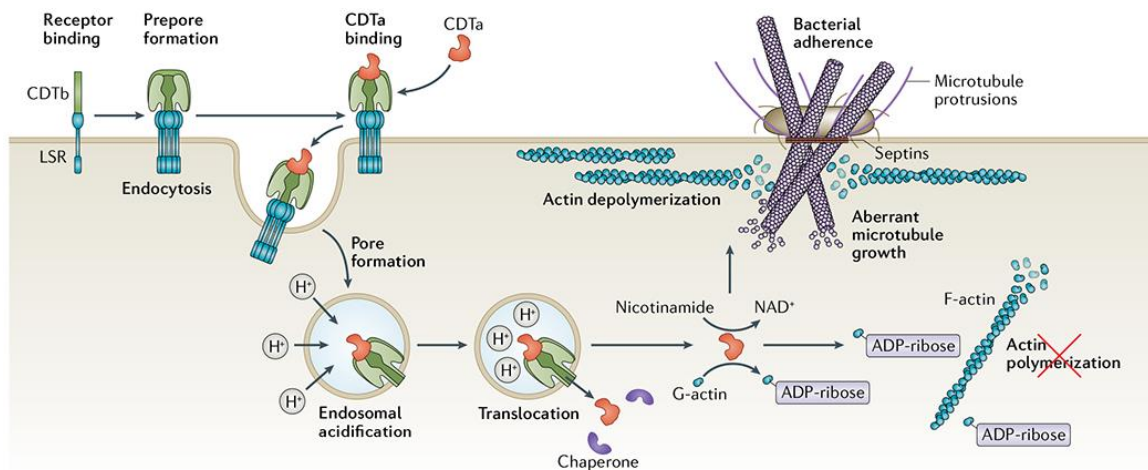


Figure 17 : Représentation du mécanisme d'action des CDT

Après la liaison de CDTb à son récepteur LSR, le récepteur s'accumule en rafts lipidiques et CDTb s'oligomérisé pour former un heptamère. CDTa peut alors se lier à l'extrémité N-terminale de CDTb, ce qui provoque l'endocytose du complexe toxine-récepteur dans la cellule. L'acidification de l'endosome favorise le changement de conformation du complexe, l'insertion dans la membrane de l'heptamère et la libération de CDTa dans le cytoplasme. Celle-ci exerce alors son activité ADP-ribosyl transférase sur l'actine, bloquant ainsi la synthèse de nouveaux filaments et provoquant la dépolymérisation des filaments existants.

D'après (Kordus *et al.*, 2022).

Cette liaison est suivie par l'accumulation du récepteur en rafts lipidiques, oligomérisation et l'induction de l'endocytose (Hemmasi *et al.*, 2015; Papatheodorou *et al.*, 2010). De même que TcdA et TcdB, l'acidification de l'endosome va induire l'insertion dans la membrane et la formation de pore par CDTb. Ceci permettra la translocation du CDTa dans le cytosol. Cette étape est favorisée par les protéines chaperones de l'hôte comprenant Hsp90 et la cyclophiline (Kaiser *et al.*, 2011; Ernst *et al.*, 2015). CDTa ADP-ribosyle de façon irréversible les monomères de l'actine G. Cela conduit à une dépolymérisation complète du cytosquelette d'actine qui entraîne la perte de la fonction de l'intégrité de la barrière épithéliale et la perturbation des jonctions serrées (Schwan *et al.*, 2009; Aktories *et al.*, 2011).

Contribution de la toxine binaire dans la virulence de *C. difficile*

Des souches productrices de CDT mais pas de TcdA ni de TcdB (TcdA-TcdB-CDT+) ont été isolées chez quelques patients avec des symptômes digestifs minimes avec peu d'infections sévères rapportées, mais la contribution de CDT dans l'infection n'est pas claire (Geric *et al.*, 2003; Eckert *et al.*, 2014; Androga *et al.*, 2015). Plusieurs études ont rapporté que la production de CDT en plus de TcdA et TcdB par *C. difficile* est associée à une augmentation de la virulence avec une mortalité plus élevée et à un risque de récurrence plus important chez l'Homme. Ces données suggèrent que la toxine binaire joue un rôle important dans la physiopathologie de l'ICD (Barbut *et al.*, 2007; Bacci *et al.*, 2011; Stewart *et al.*, 2013). Kuehne *et al.* ont cherché à savoir si CDT pouvait influencer la virulence de *C. difficile* en présence de TcdA ou de TcdB. Pour cela, ils ont créé plusieurs mutants isogéniques de toxines dans la souche R20291. Ils ont observé que le mutant TcdA+TcdB-CDT+ était plus virulent chez le hamster que le mutant isogénique TcdA+TcdB-CDT-, suggérant que CDT agit en synergie avec TcdA afin de renforcer la virulence de *C. difficile* (Kuehne *et al.*, 2014).

Résumé du chapitre 1

Clostridioides difficile anciennement connu sous le nom de *Clostridium difficile* est un bacille Gram positif anaérobie strict décrit pour la première fois en 1935 après une analyse de la composition de la flore intestinale de nouveau-nés. L'évolution des outils génétiques a permis de mieux caractériser cette bactérie en identifiant les facteurs de colonisation et de virulence impliqués dans l'infection par *C. difficile*. Cette bactérie existe sous deux formes distinctes : la forme sporulée et la forme végétative. La spore, qui est la forme métaboliquement dormante représente la forme de résistance à diverses conditions telles que l'oxygène, la température extrême, l'alcool, les désinfectants ou les antibiotiques. Elle représente également la forme de dissémination de la bactérie, de persistance dans l'environnement (animaux, sols, aliments, établissements de soins etc...) et la forme transmissible par voie orale suite à une contamination à partir de l'environnement. En réponse à des signaux environnementaux, notamment la présence des acides biliaires, les spores de *C. difficile* peuvent germer pour donner la forme végétative. Cette forme métaboliquement active est responsable de la colonisation du tube digestif grâce à ses facteurs impliqués directement ou non dans l'adhésion aux cellules épithéliales intestinales de l'hôte et dans la mobilité de *C. difficile* sur le site de l'infection dont les protéines de la couche S (SlpA, Cwp66, Cwp84), les protéines flagellaires (FliC et FliD), la protéine du choc thermique (GroEL), les pili de type IV. Les cellules végétatives produisent également des toxines TcdA, TcdB représentant les facteurs de virulence majeurs de *C. difficile*. Ces deux toxines agissent en synergie et les lésions résultant de leur production conduisent aux signes cliniques de l'infection.

Dans le chapitre 2 nous allons aborder le cycle infectieux et les manifestations cliniques des ICD ainsi que l'épidémiologie associée aux ICD et les différents traitements visant à contrôler l'infection.

Chapitre II : les infections à *Clostridioides difficile*

A. Le cycle infectieux de *Clostridioides difficile*

La physiopathologie des infections à *C. difficile* commence par l'acquisition de spores de *C. difficile* dans les établissements de soins ou partir de l'environnement (Figure 18). Les spores ingérées par voie orale, vont résister à l'acidité gastrique, passer la barrière gastrique, atteindre l'intestin grêle. Lorsqu'il y a une dysbiose du microbiote digestif induite par les antibiotiques et la modification du profil des acides biliaires en faveur des acides biliaires primaires, les spores de *C. difficile* vont germer en formes végétatives. Les cellules végétatives vont se multiplier par la suite pour coloniser le côlon et produire ses toxines.

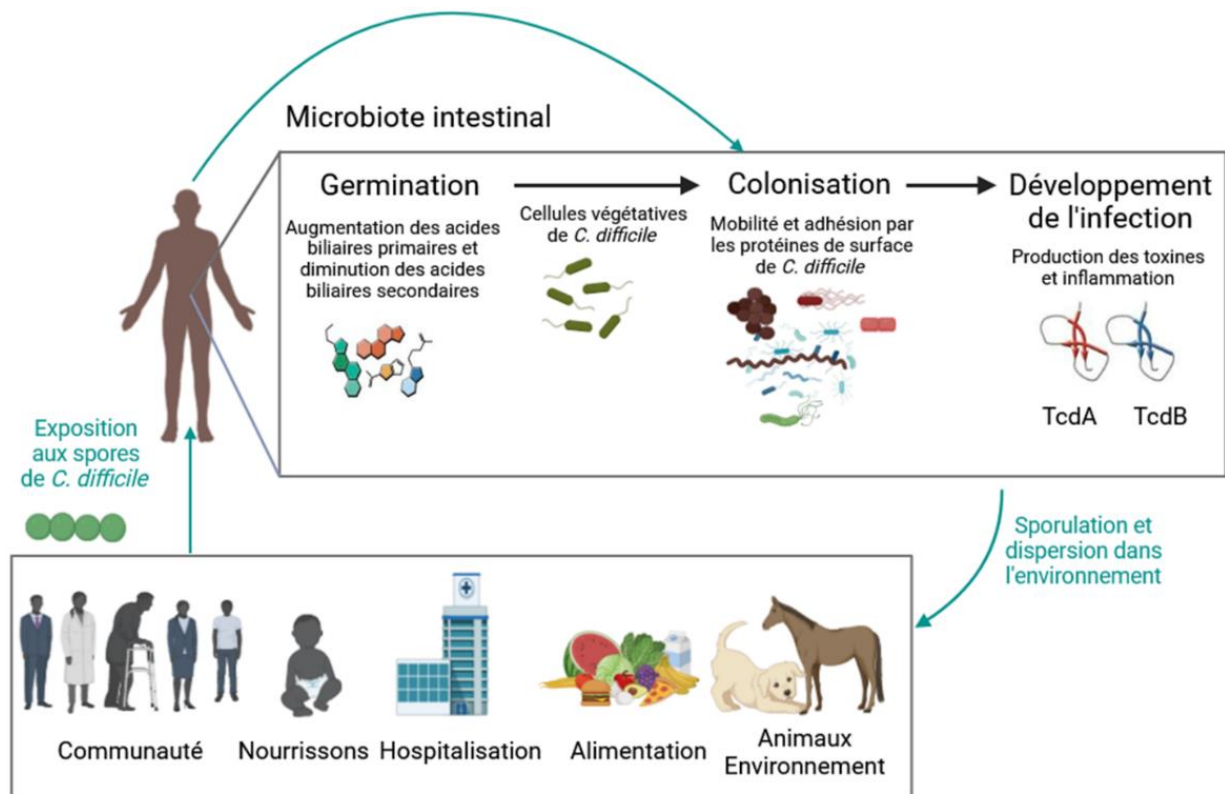


Figure 18 : Le cycle infectieux de *C. difficile*.

Adaptée de (Seekatz and Young, 2014) et créée avec BioRender.com

La production de toxines entraîne l'altération du cytosquelette d'actine et induit la perte de l'intégrité de l'épithélium, la mort cellulaire conduisant au recrutement de nombreux polynucléaires neutrophiles de l'hôte sur le site de l'infection afin d'éliminer le pathogène. Ceci conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et donc à une forte réaction inflammatoire au niveau du colon responsable des manifestations cliniques de l'infection.

Enfin, dans certaines conditions défavorables, les cellules végétatives vont à nouveau entrer en sporulation pour former des spores qui seront libérées puis disséminées dans l'environnement (Curry, 2010; Seekatz and Young, 2014; Smits *et al.*, 2016).

B. La colonisation asymptomatique

Certains individus asymptomatiques peuvent être porteurs de souche non toxigènes et également de souches toxigènes. En effet, suite à la colonisation du tube digestif de l'hôte par une souche toxigène, dans certains cas, la production de toxines ne sera pas accompagné de signes cliniques (Smits *et al.*, 2016). Le taux du portage asymptomatique observé dans la population générale de tout âge varie entre 4 - 15 % selon les études (Galdys *et al.*, 2014). On observe cependant une prévalence très différente en fonction de l'âge. Ainsi, il peut atteindre jusqu'à 90% des nourrissons qui sont fortement colonisés durant leur première année de leur vie (Rousseau *et al.*, 2011a; Furuya-Kanamori *et al.*, 2015). Cependant, ce taux diminue progressivement à partir de la deuxième année de vie des enfants pour se rapprocher du taux observé chez l'adulte avec moins de 3% (Jangi and Lamont, 2010). Ce taux important de colonisation chez l'enfant, y compris par des souches toxigènes de *C. difficile* sans que cela ne s'accompagne de symptômes cliniques d'infection a été qualifiée de « paradoxe infantile ».

Bien que le portage asymptomatique soit moins fréquent chez les adultes comparativement aux nourrissons, il reste variable au sein de la population générale. Il a été démontré que le portage asymptomatique est plus prévalent dans les hébergements gériatriques et dans les établissements de soins avec un taux pouvant aller jusqu'à 51% (Riggs *et al.*, 2007; Klaus *et al.*, 2016). Par ailleurs, la prévalence du portage d'une souche de *C. difficile* augmenterait avec la durée d'hospitalisation et le type d'hospitalisation (services de court séjour, de long séjour ou de soins de suite et de réadaptation) (Le Monnier *et al.*, 2022). Ces données suggèrent qu'il est impératif d'instaurer des mesures de contrôle de l'infection efficaces pour prévenir la diffusion de *C. difficile* parmi les porteurs. De plus, dans une étude réalisée par Klaus *et al.*, 7 sur 8 (87,5%) patients porteurs de souche toxigène de *C. difficile* avant leur hospitalisation ont développé une ICD au cours de l'étude (Klaus *et al.*, 2016).

Plusieurs hypothèses non exclusives ont été avancées pour expliquer ce portage asymptomatique chez l'enfant, notamment l'absence des médiateurs de la toxicité tels les récepteurs des toxines de *C. difficile*, des éléments important dans le processus physiopathologique ainsi que la protection conférée par le lait maternel et le développement du microbiote, étape importante au cours de la première année de la vie (Jangi and Lamont, 2010). Par ailleurs, chez l'adulte, ce portage pourrait s'expliquer par la composition du microbiote intestinal et/ou le taux élevé d'anticorps dirigés contre les toxines de *C. difficile* qui auraient un effet protecteur contre le développement des symptômes cliniques (Mulligan *et*

al., 1993; Kyne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2015). A ce jour, les déterminants qui font que cette colonisation n'est pas associée à des signes cliniques restent mal comprise.

Enfin, il est important de noter que les patients porteurs asymptomatiques qu'ils soient adultes ou enfants, représentent un réservoir de la bactérie et constituent ainsi une source potentielle de transmission de *C. difficile* notamment dans les établissements de soins et dans l'environnement (Rousseau *et al.*, 2011a; Guerrero *et al.*, 2013; Alasmari *et al.*, 2014).

C. Manifestations cliniques et évolution des infections à *Clostridioides difficile*

Les manifestations cliniques des ICD sont hétérogènes et peuvent aller d'une simple diarrhée post-antibiotiques à des formes plus sévères pouvant dans certains cas être associées à des complications comme les colites pseudomembraneuses, le mégacôlon toxique, l'iléus paralytique pouvant entraîner un choc septique et la mort du patient.

- Les diarrhées simples

Les formes simples d'ICD se manifestent le plus fréquemment par une diarrhée survenant suite à une antibiothérapie et ne présentant ni glaires, ni sang visibles. Elles peuvent parfois être associées à une fièvre modérée et des douleurs abdominales de type spasmodique. La diarrhée disparaît spontanément généralement à l'arrêt du traitement antibiotique inducteur de la dysbiose du microbiote digestif (voir les facteurs de risque). On parle ainsi de diarrhées post-antibiotiques (Farrell and LaMont, 2000).

- Les formes sévères d'ICD

L'exacerbation de l'inflammation suite à la rupture de la barrière épithéliale conduit à des formes sévères des ICD et au développement des colites pseudomembraneuses (CPM). La CPM est une maladie inflammatoire du côlon décrite pour la première fois en 1893 et caractérisée par des nodules jaune-blancs surélevés formant des pseudomembranes sur la surface de la muqueuse intestinale (Farooq *et al.*, 2015) (Figure 19). Elle précède des diarrhées abondantes, généralement non sanglantes et accompagnées parfois de fièvre et des douleurs abdominales. Au niveau biologique, elle est caractérisée par une hyperleucocytose et une augmentation de protéine C réactive (CRP).

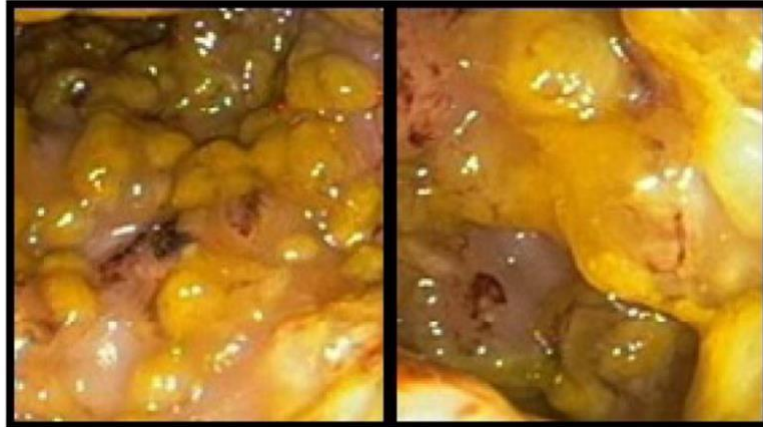


Figure 19 : Colite pseudomembraneuse chez un patient ICD.

D'après (Farooq *et al.*, 2015).

Actuellement, *C. difficile* est considéré comme responsable de plus de 95% des CPM. En dehors de *C. difficile*, il existe d'autres origines des CPM comme des infections bactériennes (*E. coli*, *Klebsiella oxyta*, *Salmonella spp.*) ou virales (cytomégalovirus) et des maladies inflammatoires de l'intestin. (Farooq *et al.*, 2015).

Il est néanmoins très complexe de catégoriser ces formes sévères. Plusieurs sociétés savantes ont proposé de définir différents critères et scores permettant de catégoriser les ICD sévères (Tableau 1).

Selon l'ESCMID « *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* », une ICD est considérée sévère si elle présente au moins l'un des symptômes des colites à savoir la fièvre ($> 38,5^{\circ}\text{C}$), des douleurs abdominales importantes, un iléus colique ou une dilatation et une distension avec peu ou pas de diarrhées et associées à des marqueurs de mauvais pronostic tels que des leucocytes $> 15\ 000/\text{mm}^3$, une diminution de l'albumine $< 30\ \text{g/L}$, une augmentation de la créatinine $> 133\ \mu\text{mol/L}$ ou une augmentation $> 50\ \%$ par rapport à la créatinine de base (van Prehn *et al.*, 2021).

Tableau 1 : Exemple des principaux critères permettant de catégoriser les formes sévères d'ICD.

ESCMID (≥1 critère) (van Prehn <i>et al.</i> , 2021)	Leucocytes > 15.000/m ³	Augmentati on créatinine > 50% la valeur initiale	Fièvre >38,5°C	Albumine < 30 g/L Lactate ≥ 5 mmole/L	Frissons, signe d'iléus, signe de péritonite, instabilité hémodynamique, CPM, distension colique >6 cm, épaissement de la paroi colique, densité de la graisse péricolique, ascite sans autre cause
IDSA- SHEA (<i>Leuco ou créat</i>) (Johnson <i>et al.</i> , 2021a)	Leucocytes > 15.000/m ³	Sérum créatinine >1,5x la valeur de base			Hypotension, choc, iléus, ou mégacôlon
ACG (<i>Albumine + leuco ou douleurs abdominale s</i>) (Kelly <i>et al.</i> , 2021)	Leucocytes > 15.000/m ³	Sérum albumine <3 g/dL			Douleurs abdominales liées à ICD
Zar <i>et al.</i> (<i>Score ≥2</i>) (Zar <i>et al.</i> , 2007)	Leucocytes >15.000/m ³ (1 point)	Sérum albumine <2,5g/dL (1 point)	Fièvre >38°C (1 point)	Age > 60 ans (1 point)	CPM ou admission en réanimation pour l'ICD (2 points)
ASID (Trubiano <i>et al.</i> , 2016)	Leucocytes > 15.000/m ³	Augmentati on créatinine > 50% la valeur initiale	Fièvre >38,5°C	Albumine <25 mg/L	Rigidité, instabilité hémodynamique, signes de péritonite, d'iléus ou de mégacôlon toxique, taux de lactate élevé, distension du gros intestin, épaissement de la paroi colique, densité de la graisse péricolique, ascite sans autre cause).

- Les complications

Les colites peuvent se compliquer et évoluer en colites fulminantes ou conduire à un choc septique avec une détresse respiratoire, à une instabilité hémodynamique, à des perforations coliques, un mégacôlon toxique ou encore à un iléus paralytique nécessitant une intervention chirurgicale (Farrell and LaMont, 2000). Toutefois, ces complications ne sont pas spécifiques de *C. difficile*, elles peuvent par exemple être dues à différentes pathologies comme les colites ischémiques et la maladie de Crohn.

D. Les facteurs de risque des infections à *Clostridioides difficile*

Plusieurs facteurs de risque sont associés aux ICD, ils sont variés et peuvent être catégorisés en 3 types :

- a) Les facteurs de risque favorisant l'exposition aux spores de *C. difficile*
 - b) Les facteurs favorisant la colonisation
 - c) Les facteurs liés à l'hôte et favorisant l'infection
-
- a) L'hospitalisation répétée et les séjours prolongés à l'hôpital représentent un risque important pour l'acquisition des spores de *C. difficile* (McDonald *et al.*, 2006; Kelly, 2012). En effet, la présence de patients symptomatiques ou asymptomatiques au sein des établissements de soins ainsi que la résistance des spores à certains désinfectants non sporicides représentent une source de transmission importante pour les spores de *C. difficile*. En dehors de l'environnement hospitalier, les spores de *C. difficile* peuvent être également être acquises à partir de diverses sources telles que l'alimentation, les animaux de compagnie et les animaux destinés à l'alimentation, l'eau, ou le sol (Lim *et al.*, 2020).
 - b) Parmi les facteurs favorisant la colonisation, les inhibiteurs de pompes à protons (Lin *et al.*, 2022), les anti-acides, les chimiothérapies, les lavements, l'usage de sondes nasogastriques, la chirurgie gastrointestinale et les laxatifs peuvent permettre l'implantation de *C. difficile* dans le tube digestif (De Roo and Regenbogen, 2020). Cependant, l'antibiothérapie reste le facteur de risque majeur des ICD. Les antibiotiques à large spectre, en particulier ceux ciblant les bactéries anaérobies, perturbent le microbiote intestinal et favorisent ainsi l'implantation de *C. difficile*. En effet, des études ont montré que des antibiotiques à spectre large comme les β -lactamines (amoxicilline), la clindamycine, les céphalosporines de deuxième (C2G) et de troisième génération (C3G) et les fluoroquinolones représentent un risque élevé pour le développement des ICD (Bartlett, 1981; Brown *et al.*, 2013; Slimings and Riley, 2014).

Contrairement à ces antibiotiques, la rifampicine, la tétracycline et les macrolides sont quant à eux considérés comme à moindre risque.

- c) Enfin, une fois colonisé, plusieurs facteurs de risque liés à l'hôte vont augmenter le risque de l'évolution vers l'infection. On retrouve notamment l'âge avancé (> 65 ans), la présence de comorbidités telles que le diabète, l'insuffisance rénale, le cancer ainsi qu'un système immunitaire affaibli (De Roo and Regenbogen, 2020).

E. Récidive des infections à *Clostridioides difficile*

L'une des particularités de l'infection à *C. difficile* est la fréquence des récurrences de l'infection dues soit à une rechute, c'est-à-dire une nouvelle infection par une souche persistante endogène ou soit à une réinfection, c'est-à-dire par l'acquisition d'une nouvelle souche exogène (Johnson, 2009). Environ 20 à 35% des patients connaissent une rechute entre 2 à 8 semaines suivant le traitement par les antibiotiques du premier épisode diagnostiqué.

Cette récurrence est caractérisée par la réapparition de la diarrhée et d'autres symptômes qui avaient disparus après le traitement du premier épisode (Garey *et al.*, 2008; Johnson, 2009).

Les facteurs de risque des récurrences d'ICD sont multifactoriels et rassemblent les principaux facteurs de risque déjà associés à la survenue du premier épisode. Parmi ces facteurs, on retrouve l'âge avancé (> 65 ans), une altération du microbiote intestinal, un système immunitaire affaibli, des comorbidités dont les pathologies sévères, une précédente ICD sévère ou encore l'hospitalisation prolongée et de l'antécédent de récurrence (De Roo and Regenbogen, 2020). Par ailleurs, le taux de récurrences augmente avec le nombre d'épisodes. Les patients ayant subi une première récurrence sont susceptibles de refaire une seconde récurrence ou des récurrences multiples dans 45%- 65% des cas (Song and Kim, 2019).

F. Les facteurs de persistance et de dissémination de *Clostridioides difficile*

La persistance de *C. difficile* dans l'environnement et chez l'hôte pourrait être expliquée par la formation de formes de résistance que sont les spores mais aussi par la constitution de biofilms. Cette faculté à persister et à survivre représente un risque supplémentaire de récurrence des ICD (Frost *et al.*, 2021; Normington *et al.*, 2021).

En effet, comme décrit dans le chapitre 1, les spores de *C. difficile* sont résistantes à nombreux agents, contrairement aux formes végétatives. De plus, elles sont ubiquitaires et peuvent persister dans l'environnement notamment dans les établissements de soins sur les surfaces mais aussi dans les sols. Enfin, ces spores sont transmissibles par voie orale suite à une contamination à partir de l'environnement.

Les biofilms, désignent quant à eux l'ensemble d'une communauté sessile de micro-organismes capable d'adhérer à des surfaces biotiques ou abiotiques, de se multiplier et de produire des matrices extracellulaires hydratées, généralement composées de protéines, de polysaccharides et d'acides nucléiques (Taggart *et al.*, 2021). La formation des biofilms se déroulent en 4 étapes (Figure 20) : 1) adhésion à la surface ; 2) croissance ; 3) maturation et enfin 4) dispersion. Cette dernière étape est déclenchée par un signal externe : une perturbation physique ou par une signalisation cellulaire (Taggart *et al.*, 2021).

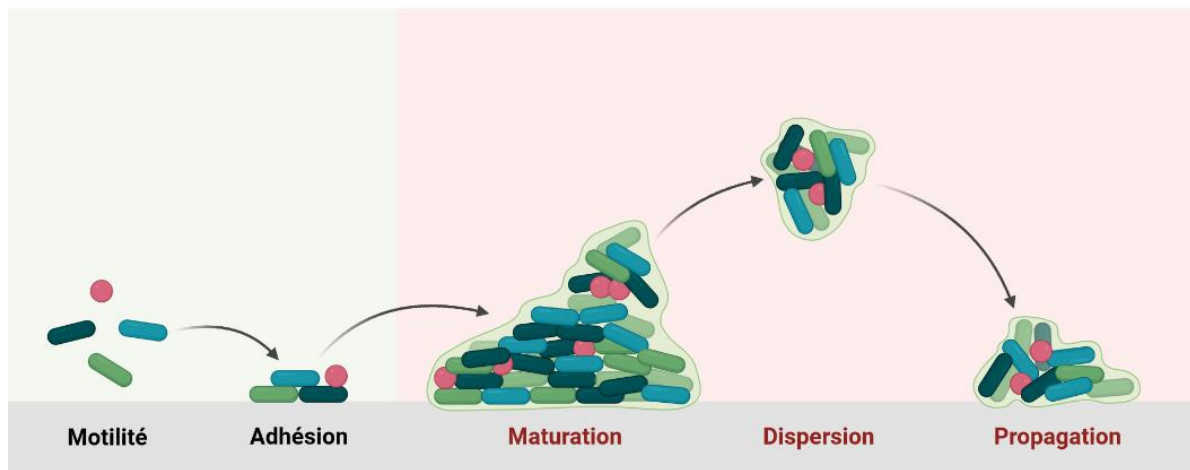


Figure 20 : Les étapes de la formation d'un biofilm.

Les cellules planctoniques mobiles adhèrent à la surface et commencent à former des microcolonies en produisant une matrice extracellulaire hydratée composée de protéines, de polysaccharides et d'acides nucléiques. Un biofilm mature peut contenir des sous-populations de bactéries sous différents états et la dispersion du biofilm peut se produire en raison d'une perturbation physique ou d'une signalisation cellulaire.

Adaptée de (Taggart *et al.*, 2021) et créée avec BioRender.com

Les infections impliquant la formation de biofilms bactériens sont caractérisées comme étant persistantes, résistantes aux stress environnementaux chroniques et extrêmement difficiles à traiter en raison de la tolérance accrue aux antibiotiques des bactéries intégrées dans les biofilms (Donelli *et al.*, 2012; Percival *et al.*, 2015; Tumbarello *et al.*, 2012). Certains facteurs comme les protéines de surface de *C. difficile*, les concentrations sub-inhibitrices en acides biliaires, des traitements par le métronidazole ou la vancomycine peuvent induire la formation de biofilms *in vitro* (Dapa and Unnikrishnan, 2013; Dubois *et al.*, 2019; Vuotto *et al.*, 2016). Cette formation de biofilms pourrait par conséquent conférer une tolérance aux antibiotiques (Hall and Mah, 2017) (Figure 21). De plus, il a été observé que les biofilms de *C. difficile* peuvent contenir des spores dormantes ce qui pourrait réduire l'efficacité de la germination de ces spores en formes végétatives et ainsi le processus de colonisation (Semenyuk *et al.*, 2014). Enfin, quelques études *in vivo* dans un modèle d'infection chez la souris ont montré que *C.*

difficile est capable de former des biofilms mono-espèce ou multi-espèces en présence de plusieurs genres bactériens appartenant aux Bacteroidetes et aux Firmicutes dans la couche externe du mucus (Semenyuk *et al.*, 2015; Soavelomandroso *et al.*, 2017).

Dans l'ensemble, ces données montrent l'importance des biofilms de *C. difficile* dans la virulence et la persistance de l'ICD et donc expliquent en partie les résistances observées. Une meilleure compréhension de la dynamique des biofilms *in vitro* et *in vivo* dans l'ICD pourrait permettre l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques.

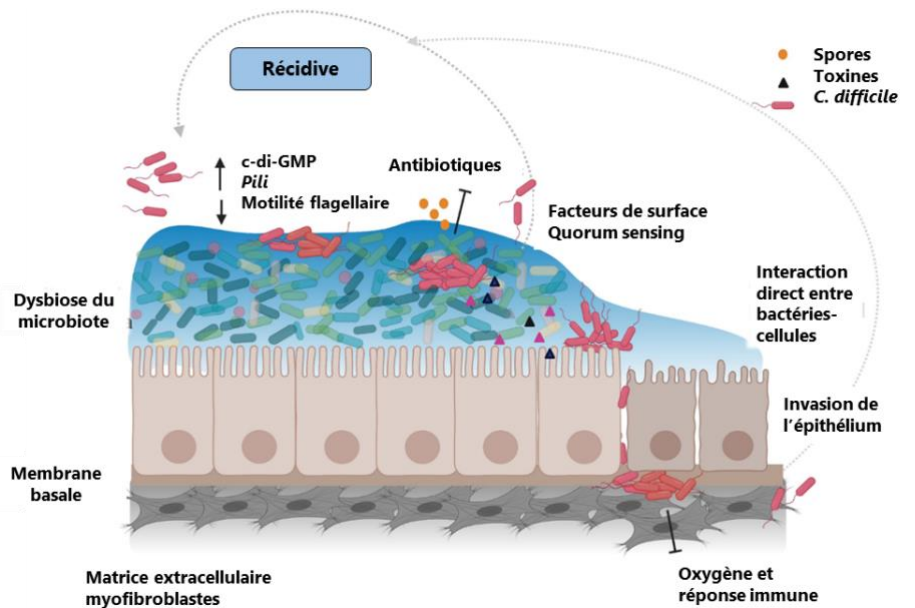


Figure 21 : Représentation d'un modèle de biofilm de *C. difficile* pendant l'infection.
Adaptée de (Frost *et al.*, 2021).

G. Epidémiologie

L'augmentation de l'utilisation des antibiotiques en clinique humaine et en usage vétérinaire serait à l'origine de l'émergence et la sélection de nouvelles souches virulentes reflétant l'adaptation de *C. difficile* suite à la pression de sélection par ces antibiotiques.

Aux États-Unis, les hôpitaux ont détecté environ 500 000 cas d'ICD en 2011, ce chiffre a baissé pour atteindre 223 900 cas en 2017. L'incidence de ces infections était estimée à 93,5 cas pour 100 000 habitants en 2011. En 2020, le taux d'incidence globale de l'ICD a été évaluée à 101,3 cas pour 100 000 habitants, dont 51,2 cas pour 100 000 habitants en milieu communautaire et 50,1 cas pour 100 000 habitants en milieu nosocomial (Centers for Disease Control and Prevention, 2023). Ainsi, l'ICD est autant nosocomiale que communautaire.

En Europe, *C. difficile* est responsable de plus de 120 000 infections par an (European Centre for Disease Prevention and Control., 2016). Entre 2012 – 2013, il a été enregistré en moyenne 7 cas pour 10 000 patients (Davies *et al.*, 2014).

En France, l'incidence des ICD est passée de 2,2 cas pour 10 000 patients-jour dans les hôpitaux en 2009 à 3,9 pour 10 000 patients-jour en 2012, pour se situer à 3,6 cas pour 10 000 patients-jour entre 2016 et 2017 (Colomb-Cotinat *et al.*, 2019).

En ce qui concerne la mortalité associée aux ICD, aux États-Unis, il a été enregistré environ 29 000 décès en 2011 (Lessa *et al.*, 2015) avec une diminution du nombre de décès en 2017 s'élevant à 12 800 décès dans les établissements de soins (Centers for Disease Control and Prevention, 2023). En Europe, environ 8 700 décès ont été signalés en 2016-2017 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022).

L'infection à *C. difficile* entraîne des coûts supplémentaires liés aux frais d'hospitalisation. Selon une étude, aux États-Unis, le coût annuel de la prise en charge des ICD varie entre 436 millions à 3 milliards de dollars par an (Heimann *et al.*, 2018). L'ECDC « *European Centre for Disease Prevention and Control* » a estimé le coût annuel de la prise en charge des ICD à près de 3 milliards d'euros en 2006 (Kuijper *et al.*, 2006). En France, une étude réalisée en 2015 a révélé que les ICD entraînaient un coût supplémentaire moyen par séjour hospitalier estimé à 9 575 euros, ce qui équivaut à une projection de 163,1 millions d'euros à l'échelle nationale dont 12,5 % étaient directement attribués aux récurrences (Le Monnier *et al.*, 2015).

Emergence de souches « hypervirulentes »

Une augmentation de l'incidence des ICD a été observée en 2001 aux États-Unis et au Canada (Warny *et al.*, 2005) et plus tard dans des pays de l'Europe, notamment la Belgique, l'Angleterre, les Pays-Bas et la France (Steenbergen *et al.*, 2005; Tachon *et al.*, 2006; Warny *et al.*, 2005). Ces ICD étaient décrites comme plus graves, plus réfractaires aux traitements standards et associées à des taux plus élevés de récurrences, de complication et de mortalité. Cette sévérité était associée à l'émergence de nouvelles souches, dites « hypervirulentes », notamment la souche de PCR ribotype (RT) 027, plus virulentes que celle décrites dans les 1990s (RT 001). Dans la littérature, ces souches RT027 sont référencées en tant que souches BI/NAP1/027 faisant référence au PCR-ribotype 027 /PFGE « *Pulse Field Gel Electrophoresis* » type NAP1 « *North American pulsotype1* » appartenant au toxinotype III et au groupe B1 de la REA « *Restriction Endonuclease Analysis* » (Warny *et al.*, 2005; Rupnik *et al.*, 2009).

Le RT027 est également caractérisée par la présence d'une troisième toxine, CDT (décrite dans le chapitre 1) et d'une mutation de 18 paires de bases (pb) en position 117 dans le gène *tcdC* qui régule négativement l'expression des gènes des toxines *tcdA* et *tcdB* (McDonald *et al.*, 2005). Il a été montré que la mutation dans le gène *tcdC* induit une perte de fonction de la protéine TcdC, favorisant ainsi une surexpression des toxines A et B et contribuant ainsi à la virulence accrue de la souche (Warny *et al.*, 2005).

De plus, ces souches épidémiques présentent un taux de résistance élevé à certains antibiotiques notamment les fluoroquinolones de troisième génération, telles que la moxifloxacine, qui ont une action à la fois sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif et sont largement utilisées en clinique (Razavi *et al.*, 2007).

Répartitions des ribotypes

La surveillance épidémiologique des ICD est une préoccupation majeure dans les pays industrialisés tels que les Etats-Unis, le Canada, la France, la Belgique, l'Angleterre et les Pays-Bas, pour lesquelles il existe des données de surveillance épidémiologique permettant le suivi de l'évolution de la prévalence des différents clones de *C. difficile* (Figure 22). Aux Etats-Unis et au Canada, les ribotypes les plus couramment observés sont le RT027, le RT017, le RT018 et le RT078. En France, les ribotypes les plus fréquents sont le RT014/020/077 et le RT078 (Colomb-Cotinat *et al.*, 2019).



Figure 22 : Distribution géographique des ribotypes de *C. difficile* dans le monde.
D'après (Markovska *et al.*, 2023).

Bien que les ICD soient principalement étudiées en Europe et en Amérique du Nord, d'autres pays d'Asie, d'Amérique latine, d'Afrique et l'Australie sont également touchés (Shin *et al.*, 2016).

En Asie, les ribotypes les plus répandus sont le RT017 et le RT018. Ces souches TcdA-TcdB+ sont associées à des ICD plus sévères. Les RT027 et le RT078 sont également observés avec une prédominance du RT078 (Collins *et al.*, 2013).

En Amérique latine, les ICD sont plus fréquemment observées en milieu communautaire en comparaison des ICD nosocomiales. Les souches les plus prévalentes dans ces régions sont le RT027, le RT017 (TcdA- TcdB+, toxinotype 8), le RT014 et le RT106 (Shin *et al.*, 2016).

En Afrique, peu de données sur les ICD ont été publiées en raison du manque de ressources, de sensibilisation, d'études bien conçues et à grande échelle. Dans certains pays d'Afrique, la co-infection de l'ICD avec d'autres pathogènes est fréquente, notamment les patients atteints de VIH ou de tuberculose. Dans les selles de patients VIH-positifs, 8,6% de cas d'ICD ont été détectés au Zimbabwe et 43% au Nigéria (Onwueme *et al.*, 2011; Simango and Uladi, 2014). Les ribotypes les plus courants en Afrique, en particulier en Afrique subsaharienne, sont le RT012, le RT084, le RT097, le RT039 et le RT014/020 (Kullin *et al.*, 2022).

En Australie, les RT027 et RT078 sont peu prévalents. Les ribotypes les plus fréquemment détectés sont le RT014, le RT052 et le RT070 (Knight *et al.*, 2015; Wilson *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2016). Récemment, une émergence du RT244 a été observée et semble plus proche du RT027 avec une mutation dans le gène *tcdC* et la présence de la toxine binaire. Les souches RT244 semblent plus virulentes et sont associées à une mortalité plus importante (Lim *et al.*, 2014).

Cycle de transmission et de réservoirs

Bien que l'infection soit principalement associée aux établissements de soins, ces dernières années, des recherches se sont intéressées à l'ICD communautaire et ont mis en évidence une augmentation de la contamination des aliments et de l'environnement par *C. difficile* (Warriner *et al.*, 2017; Rodriguez Diaz *et al.*, 2018; Knight and Riley, 2019). A ce jour, *C. difficile* a été identifié dans de nombreux réservoirs, notamment un portage chez les animaux destinés à l'alimentation tels que les porcs, les bovins, les moutons, les volailles, le saumon ainsi que les fruits de mer tels que les crevettes et les moules (Figure 23). De plus, *C. difficile* peut être isolé dans divers légumes tels que les carottes, les pommes de terre et la salade. Enfin, *C. difficile* est également isolé dans l'environnement domestique de l'Homme tels que les toilettes, les sols, les pantoufles, les chaussures, les salles de bains mais aussi dans l'environnement naturel tels que dans les lacs, les sols et les rivières (Figure 23) (Lim *et al.*, 2020).

L'analyse complète du génome de plusieurs souches de *C. difficile* provenant de l'Homme ou des animaux comme par exemple les RT078 et RT014 (isolées chez l'Homme et les porcelets) et les RT014/020 (prédominantes chez l'Homme et dans l'environnement) a révélé une grande similarité génétique entre ces souches (Rodriguez *et al.*, 2014; Knetsch *et al.*, 2014; Knight *et al.*, 2016; Janezic *et al.*, 2018). Cela suggère une possible transmission de *C. difficile* entre les Hommes et les animaux par le biais des aliments et de l'environnement (Lim *et al.*, 2020). Par conséquent, *C. difficile* représente un problème majeur de la santé publique en raison de sa persistance dans l'environnement sous sa forme de spores résistantes ainsi que de son

ubiquité. La surveillance de *C. difficile* s'intègre désormais dans le cadre du concept du « One Health » (Lim *et al.*, 2020).

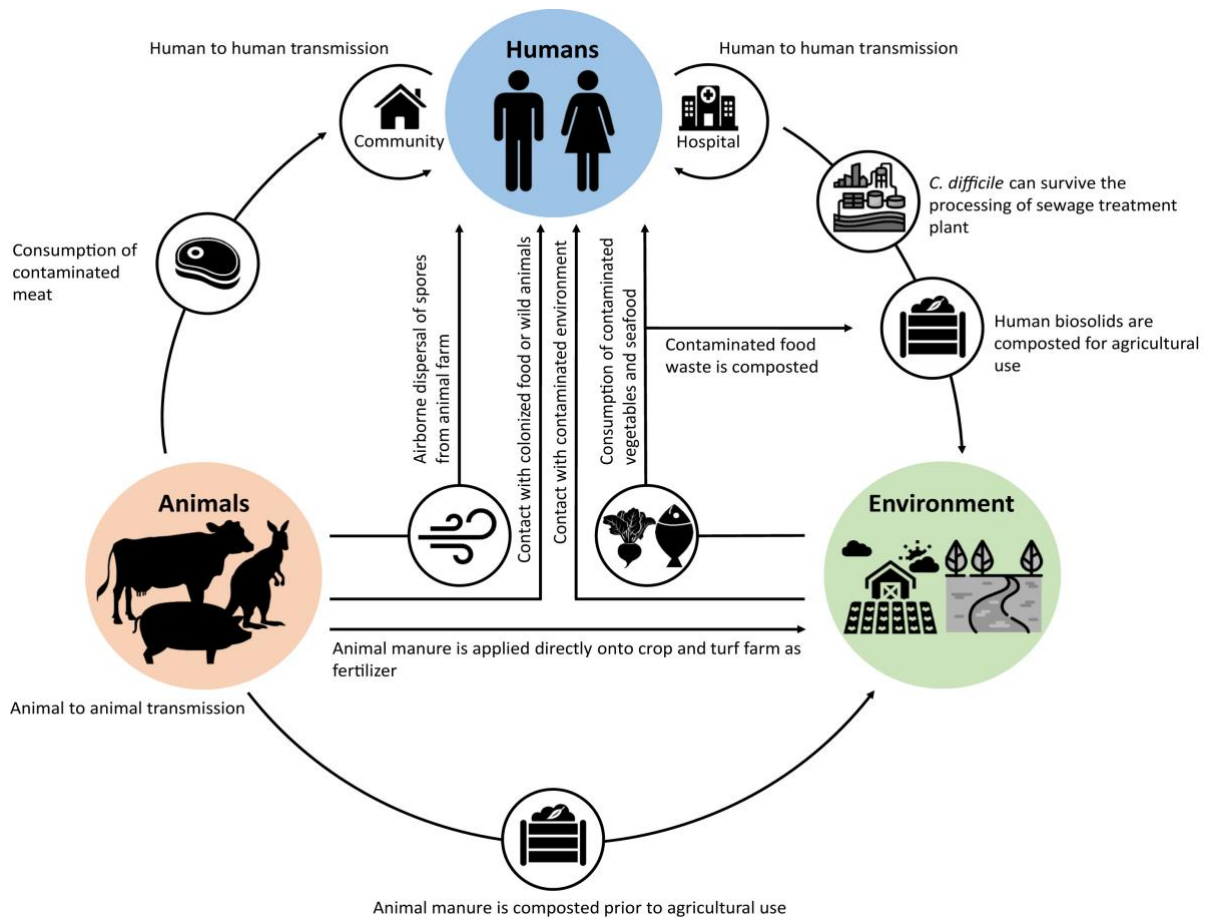


Figure 23 : Cycle de transmission de *C. difficile*.

D'après (Lim *et al.*, 2020).

H. Diagnostic de l'infection à *Clostridioides difficile*

Le diagnostic des ICD repose sur l'identification d'une souche toxigène de *C. difficile* ou de ses constituants en parallèle de la détection des toxines libres dans les selles du patient diarrhéique (Tableau 2).

La détection de *C. difficile* dans les échantillons de selles se fait par la culture sur milieu sélectif comme la CCFA additionné ou non de taurocholate. Cependant, cette méthode de détection est longue (24 – 48h) et fastidieuse. *C. difficile* est également mis en évidence par le test enzymatique ciblant la glutamate déshydrogénase (GDH), une enzyme exprimée dans toutes les souches de *C. difficile* (Gateau *et al.*, 2018).

Tableau 2 : Avantages, inconvénients et cibles des différentes méthodes de diagnostic d'ICD et leurs interprétations.

EIA : *enzyme immunoassay* ; GDH : *glutamate dehydrogenase* ; NAAT : *nucleic acid amplification test* ; VPN : *negative predictive value*. Adapté de (Gateau *et al.*, 2018).

Test	Avantage	Inconvénient	Cible	Interprétation
Test de cytotoxicité (CT ou CTA)	Spécificité élevée	Méthode longue et pas de standardisation	Présence de toxines dans les selles	ICD
EIA contre les toxines A et B	Rapidité	Faible sensibilité		
EIA contre GDH	VPN élevé	Faible spécificité	Présence de <i>C. difficile</i> dans les selles	Souche toxigène ou non
Culture	Sensibilité élevée Permet le typage et test de sensibilité aux ATB	Faible spécificité		
Culture toxigénique	Sensibilité élevée	Faible spécificité et méthode longue		
NAAT	VPN élevée Rapide	Peu spécifique et couteux	Présence d'une souche toxigène de <i>C. difficile</i>	ICD ou portage de souche toxigène

Le test de cytotoxicité CTA « *Cell Cytotoxicity Assay* », quant à lui consiste à incuber des cellules avec un filtrat de selles afin d'évaluer l'effet cytotoxique des toxines. Enfin, la détection des toxines libres dans les échantillons de selles est réalisée à l'aide de tests immuno-enzymatiques par des Kit EIA « *enzyme immunoassay* » ToxA/B qui sont rapides, simples et à coût abordable mais présentent une sensibilité relativement faible (Figure 24), (Gateau *et al.*, 2018).



Figure 24 : Exemple de test rapide pour la détection de *C. difficile* et des toxines libres dans les selles (ALERE C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE Test®).

Le test d'amplification des acides nucléiques (NAAT, « *Nuclei Acids Amplification Tests* »), permet la détection des gènes codant les toxines de *C. difficile*. Tout comme le test GDH, le NAAT ne permet pas de faire la différence entre une infection ou du portage asymptomatique, ce qui peut conduire à une interprétation excessive des résultats positifs.

Pour faciliter le diagnostic des ICD et s'affranchir des différentes limites des techniques de diagnostic, l'ESCMID « *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* » recommande de l'utilisation d'un algorithme (Figure 25) basé sur la combinaison de plusieurs méthodes de détection à savoir une méthode à haute sensibilité (EIA GDH, NAAT) et une à haute spécificité (CTA ou EIA tox A/B) pour confirmer le résultat obtenu et affirmer le diagnostic d'ICD (Gateau *et al.*, 2018).

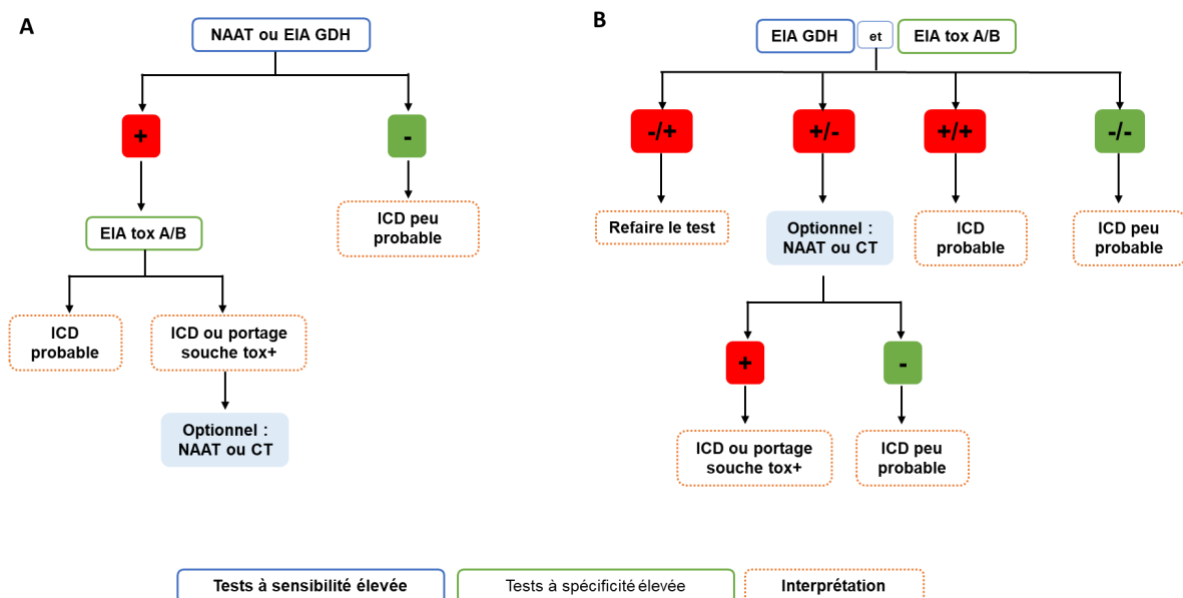


Figure 25 : Algorithme décisionnel pour le diagnostic de l'ICD.

Basée sur les recommandations de l'ESCMID. Adaptée de (Gateau *et al.*, 2018; Coullon, 2018).

I. Traitements des infections à *Clostridioides difficile*

Plusieurs mesures de prévention ont été mises en place afin de contenir la diffusion de *C. difficile* en cas d'un diagnostic confirmé d'ICD. Il est recommandé d'isoler le patient et de promouvoir une bonne hygiène des mains à la fois pour les patients et pour les soignants. De plus, des précautions doivent être prises lors de l'interaction avec les patients et il est nécessaire d'utiliser des désinfectants sporicides pour nettoyer et désinfecter l'environnement (McDonald *et al.*, 2018).

Par ailleurs, la prise en charge thérapeutique des ICD dépend de la sévérité de l'infection, des antécédents et des facteurs de l'hôte. Aussi souvent que possible, elle est d'abord basée sur l'arrêt des antibiotiques inducteurs de la dysbiose intestinale. Néanmoins, il est important de noter que presque tous les antibiotiques, y compris ceux ciblant spécifiquement *C. difficile*, induisent une dysbiose favorisant le prolongement dans le temps de la colonisation et prédisposant ainsi le patient à un autre épisode d'ICD. De plus, la capacité de cette bactérie à former des spores et des biofilms lui permet de persister dans l'environnement, et rendent difficile son élimination. Par ailleurs, la capacité de récurrence multiple de l'infection entraînant une hospitalisation prolongée et une réduction de la qualité de vie, peut également influencer la prise en charge des ICD (van Prehn *et al.*, 2021).

1. Les traitements actuels des infections à *Clostridioides difficile*

1.1. Les antibiotiques actifs contre *Clostridioides difficile*

1.1.1. Fidaxomicine

La fidaxomicine (DIFLICIR®) est un antibiotique appartenant à la classe des macrocycliques apparentée aux macrolides. Elle est très peu absorbée et elle se concentre largement dans le tractus gastro-intestinal après administration par voie orale. Elle a été approuvée par la FDA « *Food and Drug Administration* » en 2011 pour le traitement des ICD. C'est un antibiotique bactéricide à spectre étroit ayant une action sur les bactéries Gram positif, inhibant la synthèse des toxines et la formation des spores de *C. difficile* (Babakhani *et al.*, 2012). Son mécanisme d'action consiste à inhiber l'activité de l'ARN polymérase en se fixant au complexe ADN-ARN polymérase et donc la transcription avant même que celle-ci soit initiée (Venugopal and Johnson, 2012).

Bien que la fidaxomicine ait un coût important qui limite son utilisation, des études ont montré qu'en comparaison de la vancomycine, elle est plus efficace pour réduire les risques de récurrence. Deux études ont montré que la fidaxomicine confère une guérison clinique similaire à la vancomycine. Toutefois, en comparaison de la vancomycine, la fidaxomicine réduit de 10% le taux de récurrences après le traitement de l'ICD (Louie *et al.*, 2011; Cornely *et al.*, 2012). Une

récente étude par *Guery et al.* a montré que le traitement par la fidaxomicine conduit à un taux élevé de guérison clinique (92,2%) à 12 jours (2 jours après l'arrêt du traitement). Les auteurs ont également montré une faible récurrence (16,3%) dans les 3 mois suivant le traitement par la fidaxomicine chez des patients immunodéprimés et des patients atteints d'ICD sévère (*Guery et al., 2021*).

De par son spectre d'activité étroit, la fidaxomicine minimise son effet sur le microbiote intestinal. Plusieurs études chez la souris et chez l'Homme ont montré que la fidaxomicine épargne fortement les espèces du microbiote intestinal notamment les *Bacteroides*, les *Bifidobacterium*, les *Prevotella* en comparaison de la vancomycine qui réduit l'abondance relative des Bacteroidetes et les Firmicutes (*Faecalibacterium* et *Ruminococcus*) au profit des Protéobactéries (*Escherichia/Shigella* et *Klebsiella*) (*Tannock et al., 2010; Louie et al., 2012; Isaac et al., 2017; Ajami et al., 2018*). Ainsi, la fidaxomicine réduit le risque de récurrence par rapport à la vancomycine en ayant un impact plus modéré sur le microbiote intestinal.

Du fait de son efficacité et le faible risque de résistance décrites, la fidaxomicine est actuellement recommandée en première ligne pour le traitement du premier épisode d'ICD (*Johnson et al., 2021b; van Prehn et al., 2021*).

Cependant, des résistances *in vitro* ont été récemment décrites pour la fidaxomicine. Des mutations dans les sous-unités β (*rpoB*) et β' (*rpoC*) de l'ARN polymérase sont associées à la réduction de la sensibilité à la fidaxomicine (*Babakhani et al., 2011*). Néanmoins, cette baisse de sensibilité à la fidaxomicine observée pour des souches cliniques de *C. difficile* est rare. Une seule étude a identifié des mutations dans la région *rpoB* de la souche clinique Goe-91 avec une sensibilité réduite à la fidaxomicine (*Leeds et al., 2014*).

Récemment, une résistance *in vivo* de *C. difficile* à la fidaxomicine a été identifiée chez un patient ayant eu trois épisodes d'ICD en trois mois (*Marchandin et al., 2023*). Les auteurs ont identifié une seule mutation T3428G (Val1143Gly) dans le gène *rpoB* des souches isolées au cours du deuxième et troisième épisodes d'ICD. L'absence de mutation dans la souche isolée du premier épisode suggère que la résistance à la fidaxomicine est apparue au décours du traitement des deux derniers épisodes d'ICD. De plus, cette résistance est associée à une défaut de croissance, de sporulation et de production de toxines par les souches (*Marchandin et al., 2023*). Le mécanisme par lequel la résistance à la fidaxomicine est conférée aux souches de *C. difficile* reste à décrire. Cette résistance observée *in vivo* pour la fidaxomicine soulève un doute sur la pérennité de son utilisation en première intention contre les premiers épisodes d'ICD.

1.1.2. Vancomycine

La vancomycine (Vancocine®) est un antibiotique de la famille des glycopeptides avec une action bactéricide par inhibition de la synthèse de la paroi des bactéries Gram positif. En termes de mécanisme d'action, la vancomycine se lie au D-ala-D-ala en C-terminal du précurseur du peptidoglycane et empêche la réticulation des chaînes peptidiques par les transpeptidases et par conséquent inhibe la transglycosylation impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane et donc de la paroi (Murray, 1997). La vancomycine administrée par voie orale est faiblement absorbée au niveau intestinal.

Tout comme la fidaxomicine, la résistance à la vancomycine est rare chez *C. difficile*. Toutefois, l'utilisation régulière de la vancomycine dans le traitement des ICD suscite des inquiétudes quant à l'aggravation potentielle de l'émergence des Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). Chez *Enterococcus spp*, la résistance à la vancomycine est fortement observée et elle est médiée par un cluster de gènes de résistance présents sur le locus de résistance à la vancomycine (*vanG*). Ces gènes confèrent la résistance à la vancomycine en remplaçant les résidus D-Ala-D-Ala terminaux par des D-Ala-D-Ser, réduisant ainsi l'affinité de la liaison avec la vancomycine. Des gènes homologues de l'opéron *vanG*-like ou *vanG_{cd}* (renommé ainsi chez *C. difficile* afin de le différencier des autres bactéries) sont exprimés et hautement conservés (85%) parmi les souches de *C. difficile* (Ammam *et al.*, 2012). Bien que le locus de résistance puisse être fonctionnel et exprimé chez *C. difficile*, il ne semble pas conférer une résistance à la vancomycine (Ammam *et al.*, 2013). En 2012, il a été mis en évidence une augmentation du niveau de sensibilité à la vancomycine due à sa forte utilisation (Saha *et al.*, 2019). Toutefois, le mécanisme par lequel la résistance est acquise est peu connu mais il semble se faire par un transfert horizontal de gènes. En 2021, Pu *et al.* ont identifié un plasmide pX18-498 acquis dans le tractus gastro-intestinal qui aurait un rôle dans la résistance de *C. difficile* à la vancomycine. Les auteurs ont montré *in vitro* que l'acquisition du plasmide pX18-498 a pour conséquence de réduire de huit fois la sensibilité à la vancomycine (Pu *et al.*, 2021).

1.1.3. Métronidazole

Le métronidazole (FLAGYL®) est un antibiotique et un antiparasitaire appartenant à la famille des nitro-5-imidazoles. Il inhibe la synthèse des acides nucléiques et est utilisé pour le traitement des infections liées à des bactéries anaérobies ainsi qu'à des protozoaires (Scully, 1988). Il a été observé une augmentation des cas d'échec clinique avec le traitement des ICD par le métronidazole comparativement à la vancomycine. Johnson *et al.* ont réalisé une étude randomisée contre placebo chez des patients avec une ICD afin d'évaluer l'éradication du portage asymptomatique de *C. difficile* par antibiotique. Les auteurs ont rapporté une efficacité de 81% chez les patients traités par la vancomycine contre 73% chez les patients traités par le

métronidazole (Johnson *et al.*, 2014). Ces échecs thérapeutiques semblent être associés aux concentrations résiduelles retrouvées au niveau du colon alors qu'il s'agit du site de l'infection en raison d'une absorption digestive précoce au niveau de l'intestin grêle après administration par voie orale (Krutova *et al.*, 2022). Par ailleurs, le traitement par le métronidazole représente un facteur de récurrence avec à un fort taux de rechute chez les patients présentant un premier épisode d'ICD (Allegretti *et al.*, 2020).

Tout comme la vancomycine, la résistance au métronidazole est rare chez *C. difficile*. Cependant, un plasmide pCD-METRO a récemment été identifié à la fois chez les souches toxigènes et non toxigènes de *C. difficile*. Ce plasmide lorsqu'il lui est transféré horizontalement, augmente de 25 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une souche sensible de *C. difficile*, lui conférant ainsi une résistance au métronidazole (Boekhoud *et al.*, 2020).

Le métronidazole n'est à ce jour plus recommandé en première intention pour le traitement d'ICD, sauf quand la fidaxomicine et la vancomycine ne sont pas disponibles.

Tableau 3 : Comparaison des principaux antibiotiques actifs contre *C. difficile*.

Molécule	Classe	Action	Avantages	Inconvénients
Métronidazole	Nitro-5-imidazole	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	Faible coût	Spectre large 25% de taux de récurrences Absorption intestinale quasi-totale
Vancomycine	Glycopeptide	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane	Coût abordable (45 € pour un traitement de 10 jours) Absorption intestinale faible Supérieur au métronidazole	Spectre large Effet plus ou moins important sur le microbiote intestinal 25% de taux de récurrences
Fidaxomicine	Macrocyclique	Inhibition de la synthèse de l'ARN	Spectre étroit Absorption intestinale minimale 15% de taux de récurrences Épargne le microbiote intestinal	Coût élevé (1280 € pour un traitement de 10 jours)

1.2. Les autres antibiotiques ciblant *Clostridioides difficile*

Compte tenu de la dysbiose additionnelle induite par les antibiotiques utilisés pour le traitement des ICD et de la baisse de l'efficacité des molécules disponibles, de nouvelles molécules inhibitrices de *C. difficile* ont été développées ou sont en développement. L'objectif est d'identifier des molécules à spectre très étroit capables de cibler principalement *C. difficile* et avec peu d'impact sur le microbiote intestinal tout en étant plus efficace que les antibiotiques actuels. Enfin, ces molécules ne doivent pas, ou très peu, être absorbées afin d'éviter les effets indésirables généraux.

Le ridinilazole (SMT19969) est un antibiotique à un spectre d'activité étroit limité à certaines bactéries Gram positif dont *C. difficile* avec peu d'impact sur les autres bactéries du microbiote intestinal. De plus, il a une faible absorption après administration par voie orale et donc sa concentration au niveau colique est très élevée (Vickers *et al.*, 2015). Il inhibe la formation du septum lors de la division cellulaire et réduit significativement la production des toxines de *C. difficile* (Bassères *et al.*, 2016). En comparaison de la vancomycine, les résultats des essais cliniques de phase I et II avec le ridinilazole ont montré une bonne tolérance et une efficacité dans le traitement des ICD de même qu'une supériorité dans la réduction des récurrences (Vickers *et al.*, 2017). Actuellement, des essais de phase III visant à déterminer son efficacité dans le traitement des ICD et la prévention des récurrences ont été complétés, les résultats sont en attente de publication (ClinicalTrials.gov : NCT03595553).

Outre le ridinilazole, les antibiotiques existant comme la rifampicine, la tigécycline, l'acide fusidique et d'autres antibiotiques ont été proposés pour le traitement de l'ICD avec plus ou moins de succès (Petrosillo *et al.*, 2018).

Prenons l'exemple de la tigécycline, un antibiotique à large spectre appartenant aux glycylicyclines, qui agit en inhibant la synthèse des protéines bactériennes. Il a été montré *in vitro* que la tigécycline était capable d'inhiber la sporulation et la production des toxines par *C. difficile*. Par conséquent, la tigécycline représente un candidat potentiel pour le traitement des ICD (Theriot *et al.*, 2015). Cependant, des études ont montré que la tigécycline a un impact important sur le microbiote. Son utilisation dans un modèle d'infection chez la souris a été associée à une augmentation des Verrucomicrobia et des Protéobactéries (un marqueur de dysbiose et d'implantation de *C. difficile*) et une diminution significative des Bacteroidetes et des *Lactobacillaceae* (Bassis *et al.*, 2014). En revanche, si on compare cette étude à celle de Pump *et al.*, les auteurs ont montré que comparativement à d'autres antibiotiques (ceftriaxone, linézolide et piperacilline), la tigécycline avait moins d'impact sur le microbiote de la souris (Jump *et al.*, 2017). Enfin, une étude a montré que l'administration de la tigécycline par voie intraveineuse était plus efficace sur les formes sévères d'ICD en comparaison d'un traitement par vancomycine ou métronidazole (Gergely Szabo *et al.*, 2016). Ainsi, depuis 2021 la tigécycline est recommandée par l'ESCMID pour le traitement des formes sévères d'ICD (van Prehn *et al.*, 2021).

2. Les traitements alternatifs aux antibiotiques ciblant *Clostridioides difficile* actuellement recommandés

L'apparition de la résistance aux antibiotiques et le risque de récurrence dû à la persistance de la perturbation du microbiote intestinal ont conduit à l'élaboration de stratégies thérapeutiques alternatives aux antibiotiques afin de contrôler l'infection. Ces stratégies ont pour objectif soit de la restauration du microbiote intestinal par la transplantation du microbiote fécal (TMF ou FMT « *Faecal Microbiota Transplantation* »), soit la neutralisation des effets cytotoxiques des toxines produites au cours de l'ICD par l'immunothérapie (vaccination et anticorps monoclonal) (Figure 26).

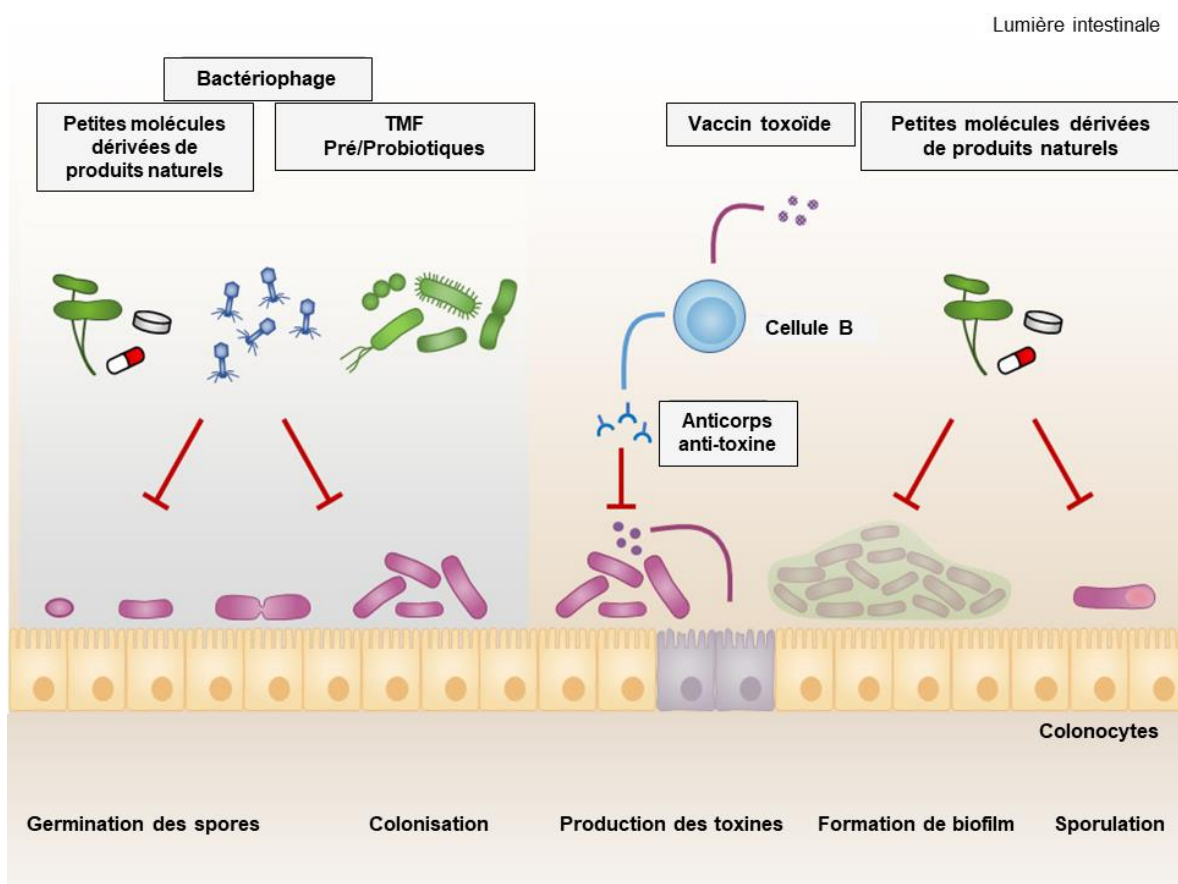


Figure 26 : Stratégies thérapeutiques alternatives aux antibiotiques ciblant *C. difficile*.
Adaptée de (Phanchana *et al.*, 2021).

2.1. Transplantation du microbiote fécal

Le principe de la TMF repose sur la restauration rapide de l'équilibre normal du microbiote intestinal par l'intermédiaire de matières fécales d'un donneur sain ayant un microbiote intestinal non dysbiotique. La TMF va ainsi restaurer le mécanisme de résistance à la colonisation dont la compétition pour les nutriments, la production de peptides

antimicrobiens, la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), et la restauration de l'équilibre du profil des acides biliaires, afin d'inhiber la croissance des cellules végétatives et la germination des spores de *C. difficile* (Segal *et al.*, 2020). Le rôle du microbiote comme barrière de protection contre les pathogènes sera détaillé dans le chapitre 3 – microbiote intestinal.

Les premiers essais randomisés de la TMF menés par van Nood *et al.* ont été réalisés chez des patients ICD d'au moins 18 ans présentant une ou de multiples récurrences. Les auteurs ont comparé différents traitements, notamment l'administration de la vancomycine suivie d'un lavage intestinal et la perfusion ultérieure d'une solution de matières fécales d'un donneur par voie duodénale à un traitement par la vancomycine seule ou par la vancomycine avec un lavage intestinal. Sur 16 patients ayant reçu de la matière fécale, 13 ont montré une guérison clinique contre 3 patients guéris dans le groupe traité uniquement par la vancomycine (van Nood *et al.*, 2013). Depuis, plusieurs essais cliniques randomisés avec ou sans contrôle ont montré une efficacité dans 80 - 94 % des cas pour la restauration du microbiote intestinal après une ou plusieurs transplantations (Quraishi *et al.*, 2017).

Plusieurs éléments peuvent impacter la qualité et les résultats d'une TMF, notamment le choix des donneurs, la qualité du recueil, de la préparation et de la conservation adéquates de la matière fécale du donneur avant cette préparation (dans les 6h suivant la production ou à conserver à température ambiante jusqu'à la préparation). Ainsi, de nombreuses équipes ont travaillé à la standardisation du protocole de TMF afin d'obtenir un meilleur taux de réussite.

Une étude a comparé l'administration par voie gastro-intestinale supérieure (UGI) et par voie gastro-intestinale inférieure (LGI). La voie LGI semble être plus efficace par rapport à la voie UGI dans la prévention de la récurrence à l'ICD, puisque les patients traités par LGI ont reçu une grande quantité de matière fécale (Furuya-Kanamori *et al.*, 2017).

Dans une étude comparative de l'administration de selles fraîches ou de selles congelées, il n'a pas été observé de différence entre les deux types d'administration (Lee *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'administration par voie orale avec des capsules semble être meilleure que l'administration par coloscopie (Kao *et al.*, 2017). L'encapsulation de la matière fécale est très importante puisqu'elle vise à simplifier les méthodes d'administration et l'acceptation de la TMF par les patients. Par ailleurs, la lyophilisation s'est également révélée efficace mais comparativement à l'administration de selles fraîches ou congelées, elle semble moins efficace (Jiang *et al.*, 2017).

La TMF a montré une efficacité dans la réduction du taux de récurrences et le traitement des ICD réfractaires malgré l'hétérogénéité des voies d'administration utilisées. Cependant, elle est difficile à contrôler, en raison de la variabilité du microbiote de chaque donneur. De plus, son efficacité sur le long terme et la sécurité de la matière fécale du donneur transplanté peut se

révéler pathologique chez les receveurs comme les personnes immunodéprimées par exemple (Groot *et al.*, 2020). D'autre part, il existe un risque de transmission d'agents pathogènes et de perturbation du microbiote intestinal pouvant entraîner d'autres pathologies (hépatite C, VIH) ou des déséquilibres métaboliques sur le long terme (diabète, obésité, autisme, asthme). Enfin, il est également possible de transférer des gènes de résistance susceptible de provoquer des infections chez le receveur (Wang *et al.*, 2019). Par conséquent, la surveillance à long terme des patients ayant subi la TMF est cruciale.

2.2. L'immunothérapie par le bezlotoxumab

La physiopathologie des ICD est essentiellement médiée par les toxines qui induisent une activité cytopathique conduisant à une forte réaction inflammatoire. Lorsque l'inflammation est maîtrisée, elle peut aboutir à une guérison mais si elle persiste elle fait intervenir l'immunité humorale. Des études ont montré qu'une réponse immune spécifiquement dirigée contre les toxines de *C. difficile* est associée à une meilleure évolution de l'infection et à un plus faible risque de récurrence. La réponse immune adaptative dans l'évolution des ICD sera détaillée dans le chapitre 3.

Ainsi, des stratégies d'immunisation passive ont été développées en se basant sur la capacité des anticorps dirigés contre les toxines de *C. difficile* à offrir une protection contre les ICD et les récurrences. Cette stratégie vise à améliorer les symptômes des ICD mais elle ne réduit pas le risque de la colonisation par *C. difficile*, la sporulation, ni la dissémination des spores dans l'environnement. Deux anticorps monoclonaux, actoxumab et bezlotoxumab ont été soumis à des essais cliniques randomisés. Ces deux anticorps ont été utilisés en association afin de neutraliser l'effet cytotoxique des toxines TcdA et TcdB.

L'actoxumab est un anticorps monoclonal humain ciblant la toxine A de *C. difficile*. Bien qu'il ait montré des effets prometteurs lors de phase I et II des essais cliniques, lors de la phase III, son association avec le bezlotoxumab n'a pas amélioré l'efficacité de ce dernier, conduisant à l'arrêt de son développement (Wilcox *et al.*, 2017).

Le bezlotoxumab (ZINPLAVA®) est un anticorps monoclonal recombinant humain produit par les laboratoires Merck® et autorisé par la FDA depuis 2016 pour le traitement des patients présentant des risques élevés de récurrence (Markham, 2016). Son mécanisme d'action consiste en la liaison via ses deux régions Fab à deux épitopes situés dans la moitié N-terminale du domaine CROPs de TcdB de *C. difficile*. Il bloque ainsi la liaison de TcdB aux cellules épithéliales de l'hôte, limitant ainsi les lésions et l'inflammation pouvant conduire aux symptômes d'ICD (Orth *et al.*, 2014).

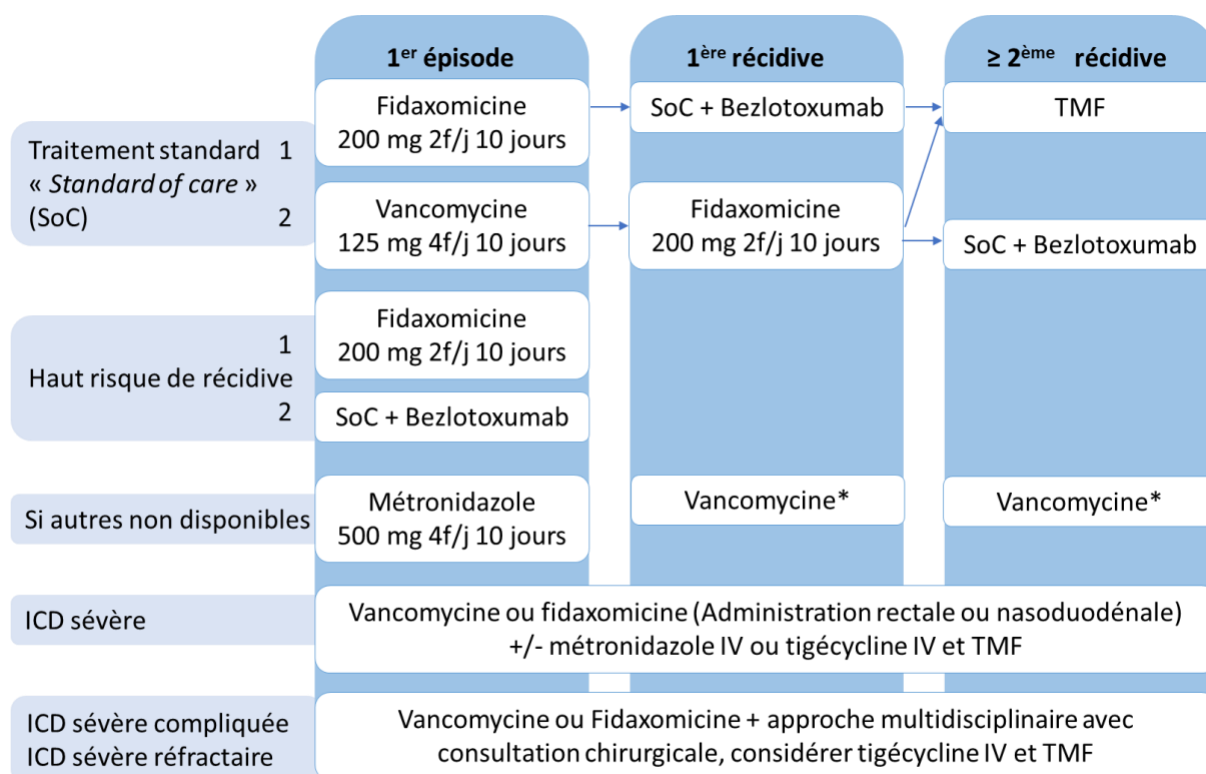
Des essais cliniques randomisés de phase I, II et III chez des patients avec un ICD simple ou une récurrence recevant les antibiotiques (métronidazole, vancomycine et fidaxomicine) ont démontré que l'association du bezlotoxumab aux antibiotiques de traitement des ICD est efficace. Elle permet d'obtenir des taux de guérison clinique similaires mais surtout un risque de récurrence réduit de 10 % par rapport au placebo (Wilcox *et al.*, 2017; Goldstein *et al.*, 2020). Bien que ces données montrent son efficacité sur la réduction des récurrences, l'utilisation du bezlotoxumab en association avec les antibiotiques standards est actuellement limitée par son coût important (Prabhu *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2021).

Une étude récente menée par Mileto *et al.* a montré que l'administration du bezlotoxumab pendant l'infection permet de réduire les lésions d'atrophie du thymus (impliqué dans la production des cellules T (*T cells*) et dans le développement du système immunitaire) et la réponse systémique provoquée par *C. difficile* (Mileto *et al.*, 2022). Ces données suggèrent que, outre la neutralisation de l'effet cytopathique de TcdB, le bezlotoxumab a un rôle supplémentaire dans les ICD.

3. Les recommandations de l'ESCMID

En 2021, les recommandations pour le traitement des ICD ont été mises à jour afin de mieux contrôler l'infection et de s'affranchir des limites des différents antibiotiques utilisés dans le traitement des ICD. Parmi les facteurs pris en compte pour ces nouvelles recommandations, on note la perte de l'efficacité du métronidazole (passant de 95% à 75%) par rapport à la vancomycine, qui a également vu son efficacité diminuer (passant de 98% à 85 %), ainsi que la réduction des risques de récurrence (Johnson *et al.*, 2021b; van Prehn *et al.*, 2021).

L'ESCMID recommande (Figure 27) en première intention l'utilisation de la fidaxomicine (200 mg 2 fois par jour pendant 10 jours) dès le premier épisode d'ICD en raison de son taux de récurrences plus faible par rapport à la vancomycine. La vancomycine (125 mg 4 fois par jour pendant 10 jours) reste une bonne alternative, surtout lorsque la fidaxomicine n'est pas disponible. Le métronidazole (500 mg 4 fois par jour pendant 10 jours) ne doit plus être utilisé sauf si aucun des deux antibiotiques n'est disponible.



* 2 semaines 4f/j puis une semaine 2f/j puis 1 semaine 4f/j puis 1 semaine 1f/48h et enfin 1 semaine 1f/72h.

Figure 27 : Les recommandations 2021 de l'ESCMID pour le traitement des infections à *C. difficile*.

Adaptée de (van Prehn *et al.*, 2021).

Par ailleurs, en cas d'une première récurrence, l'ESCMID recommande l'utilisation de la fidaxomicine en première intention ou l'anticorps monoclonal bezlotoxumab en association avec le traitement standard (fidaxomicine ou vancomycine) (Figure 27).

Dans le cas où le métronidazole est utilisé pour le traitement du premier épisode d'ICD et qu'une récurrence survient, il est recommandé pour le traitement du second épisode d'utiliser la vancomycine de manière pulsée (4 fois par jour pendant 2 semaines puis 2 fois par jour pendant une semaine puis 4 fois par jour pendant une semaine suivi d'une administration toutes les 48h pendant une semaine et enfin une fois tous les 72h pendant une semaine). Cette stratégie vise à réduire le risque de récurrence en favorisant la germination des spores de *C. difficile* suite à la dysbiose additionnelle induite par la vancomycine. Une fois les spores germées en formes végétatives, ces dernières seront sensibles à la vancomycine (McFarland *et al.*, 2002; Hota *et al.*, 2017). En cas de récurrence multiple (supérieure ou égal à 2 récurrences), il est recommandé de recourir à la transplantation du microbiote fécal. Enfin, pour les formes d'ICD sévères et compliquées, il est recommandé d'utiliser la vancomycine ou la fidaxomicine, additionnée de métronidazole ou de tigécycline administrées par voie intraveineuse (van Prehn *et al.*, 2021).

4. Les nouvelles perspectives de prise en charge des infections à *Clostridioides difficile*

Outre la TMF et l'immunothérapie, d'autres stratégies thérapeutiques alternatives aux antibiotiques ont été envisagées et sont en cours de développement afin de permettre notamment la restauration du microbiote intestinal et de s'affranchir des limites de la TMF. On retrouve notamment les probiotiques « traditionnels », les produits basés sur le microbiote (« *Microbiome-based therapeutics* ») dont les LBPs « *Live biotherapeutic products* », les produits dérivés de la TMF (« *FMT-derived products* ») et la phagothérapie.

4.1. Les probiotiques « traditionnels »

En 2001, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO « *Food and Agricultural Organization* ») et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou WHO « *World Health Organization* ») ont défini les probiotiques comme étant des microorganismes vivants (bactéries ou levures), qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Hill *et al.*, 2014). De nombreuses études ont été réalisées sur l'utilisation de ces probiotiques dans la prévention des infections à *C. difficile*, les maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable (IBS « *Irritable bowel syndrome* »). Les probiotiques auraient pour fonctions de restaurer le microbiote intestinal, de protéger l'hôte contre les pathogènes en maintenant l'effet barrière en protégeant la muqueuse intestinale et l'épithélium, en produisant certains métabolites, en inhibant de la production de toxines par certaines bactéries et en stimulant le système immunitaire (Pillai and Nelson, 2008). Les principaux microorganismes utilisés à ce jour comme probiotiques traditionnels avec un effet protecteur contre *C. difficile* et approuvées par l'AGA « *American Gastroenterology Association* » font partie des genres *Saccharomyces*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Su *et al.*, 2020). Ces souches sont utilisées soit individuellement soit en combinaison. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré leur efficacité partielle dans la prévention des ICD simples mais ces données sont hétérogènes.

Par exemple, une étude a montré que *Saccharomyces boulardii* produit une protéase capable de digérer les toxines TcdA et TcdB au niveau de colon humain (Castagliuolo *et al.*, 1999).

Un essai randomisé PLACIDE a étudié l'efficacité d'une combinaison de deux souches de *Lactobacillus acidophilus* (CUL60 et CUL21) et deux souches de *Bifidobacterium* (*B. bifidum* (CUL20) et *B. lactis* (CUL34)) sur l'incidence de l'ICD chez plus de 2500 patients âgés de 65 ans et plus et traités par antibiotiques. Cependant, les auteurs n'ont pas réussi à montrer l'efficacité de la combinaison de ces souches de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* sur la prévention de l'ICD chez ces patients (Allen *et al.*, 2013).

Une autre étude *in vitro* a évalué l'impact de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1518 présent dans les produits laitiers fermentés sur la composition du microbiote intestinal chez les personnes âgées. Lorsqu'il est ajouté, *L. paracasei* augmente l'abondance des *Lactobacillus* et des *Enterococcus* de même que celle de *Faecalibacterium prausnitzii*, producteur de butyrate (Fehlbaum *et al.*, 2019). Bien que *L. paracasei* ait modifié la composition de la flore intestinale, il n'a eu aucun effet inhibiteur sur la colonisation et la production des toxines par *C. difficile* (Fehlbaum *et al.*, 2019).

Plusieurs méta-analyses réalisées sur les essais randomisés visant à l'utilisation des probiotiques en prévention des ICD ont montré que les probiotiques réduiraient l'incidence des ICD à 1,5% versus 4% observés dans les groupes placebo (Goldenberg *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017). D'autre part, ils seraient plus efficaces lorsqu'ils sont administrés concomitamment avec la première dose d'antibiotique (2 jours après la première prise d'antibiotique) (Shen *et al.*, 2017).

Bien que des études *in vitro* et *in vivo* ont montré une certaine efficacité des probiotiques dans la prévention des ICD simples, ils ne sont pas recommandés par l'ESCMID ni par l'IDSA/SHEA en raison de l'hétérogénéité des résultats rapportés par les différents essais. Malgré cela, l'effet des probiotiques est toujours étudié.

En comparaison des autres traitements, les probiotiques semblent présenter peu d'effets secondaires majeurs chez des patients traités par les antibiotiques. Toutefois, une étude récente chez la souris et chez l'Homme a montré que l'administration des probiotiques après une antibiothérapie a paradoxalement retardé la résilience du microbiote intestinal par rapport à ce qui a été observé avec la transplantation du microbiote fécal (Suez *et al.*, 2018).

4.2. Thérapies basées sur le microbiome ("*Microbiome-based therapeutics*")

4.2.1. « *Live bioterapeutic products* » (LBPs)

Un LBP « *live bioterapeutic products* » est défini par la FDA comme étant un produit biologique contenant des organismes vivants tels que des bactéries et qui peuvent être utilisés pour la prévention, le traitement ou la guérison d'une maladie ou d'un état de santé humain (Gulliver *et al.*, 2022). Contrairement à la TMF qui transplante la totalité du microbiote intestinal, le LBP est moins diversifié et peut être constitué d'une seule souche de bactérie ou d'une sélection de plusieurs souches qui peuvent agir en synergie (Gulliver *et al.*, 2022). Parmi les LBPs qui sont en développement ou autorisé par la FDA dans le cadre de la prise en charge des ICD, on retrouve des probiotiques nouvelle génération (NGP « *next generation probiotics* »), une préparation de spores de Firmicutes (SER-109 ou Vowst™) et un consortium bactérien (VE303).

« Next generation probiotics » (NGPs)

Le développement des techniques de séquençage et des outils d'analyses bio-informatiques ont permis d'analyser le microbiote intestinal et d'identifier plusieurs candidats bactériens ayant des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. De plus, le développement de la culturomique a permis d'isoler et de cultiver ces nouveaux commensaux ou probiotiques de nouvelle génération (NGP). Ils ont été sélectionnés en fonction des pathologies (troubles métaboliques ou fonctionnels) que l'on souhaite cibler en comparaison des probiotiques traditionnels qui ne ciblent pas spécifiquement une pathologie et ont des réponses hétérogènes.

Le choix des NGP repose sur une analyse approfondie de la physiopathologie des maladies, de la caractérisation génétique et physiologique des bactéries cibles, ainsi que la détermination de leur croissance et de leur sensibilité aux antibiotiques. De plus, pour sélectionner les probiotiques adaptés, il est essentiel de mener une étude intensive du microbiote par le séquençage du génome entier par la NGS « *Next Generation Sequencing* » et l'analyse de la réponse de l'hôte aux différents métabolites par des criblages par des techniques bio-informatiques (Chang *et al.*, 2019).

Plusieurs souches ont été identifiées comme des NGP. On retrouve notamment des souches appartenant au même genre que les probiotiques traditionnels tels que *Bifidobacterium* ou *Lactobacillus* mais en plus de ceux-ci, les NGP comprennent des genres tels que *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Prevotella*, *Bacteroides* intervenant dans les différentes fonctions du microbiote intestinal (voir chapitre 3-microbiote) (Chang *et al.*, 2019).

SER-109 ou Vowst™

SER-109 ou Vowst™ est une préparation sous forme de capsules contenant des spores de Firmicutes purifiées. Bien que son mécanisme d'action soit mal compris, elle semble favoriser la restauration de l'équilibre des acides biliaires en favorisant l'activité 7- α -déshydroxylase des Firmicutes impliqués dans la biotransformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires (Jain *et al.*, 2023). Les résultats de l'essai randomisé de phase III (ECOSPOR III) avec SER-109 ont montré une efficacité plus importante, avec un taux de récurrences significativement plus faible (11,1%) en comparaison du groupe placebo (41,3 %) (Feuerstadt *et al.*, 2022). Le 26 avril 2023, la FDA a autorisé l'utilisation du SER-109 pour la prévention des récurrences des ICD. Il est prévu d'utiliser la préparation trois à quatre jours après l'arrêt du traitement par les antibiotiques afin de restaurer le microbiote une fois que les antibiotiques ont éliminé *C. difficile* (Jain *et al.*, 2023).

Le VE303

Enfin, le VE303, développé par les laboratoires Vedanta Biosciences, est un consortium bactérien défini et reproductible, composé de huit souches commensales de Clostridia. Contrairement à SER-109, le VE303 ne provient pas d'une préparation de matière fécale d'un donneur mais d'une banque de clones de cellules bactériennes pures. Le VE303 semble restaurer la résistance à la colonisation par *C. difficile* (Dsouza *et al.*, 2022). Les essais cliniques de phase I et II ont montré son efficacité et sa tolérance. De plus, le VE303 réduit le risque de récurrence en comparaison du placebo (Dsouza *et al.*, 2022; Louie *et al.*, 2023). Un essai de phase III est actuellement en cours de recrutement pour évaluer son efficacité dans la prévention des récurrences d'ICD. Ces consortiums bactériens représentent une perspective prometteuse pour le traitement des récurrences des ICD.

La souche non toxigène de *Clostridioides difficile* (NTCD-M3)

Une autre alternative à la TMF pour le traitement des ICD, est l'administration d'une souche non toxigène de *C. difficile* appelé NTCD-M3 « *Non toxinogenic C. difficile M3* ». Contrairement aux souches toxigènes, les souches non toxigènes ne possèdent pas les gènes (*tcdA* et *tcdB*) responsables de l'expression des toxines TcdA et TcdB (voir chapitre 1 – toxines).

Des études menées dans un modèle d'infection chez les hamsters ont montré que l'administration d'une souche non toxigène de *C. difficile* a conféré une protection contre l'ICD après un gavage par une souche toxigène (Sambol *et al.*, 2002; Merrigan *et al.*, 2003).

Sur la base de ces résultats prometteurs, les spores de la souche VP20621/M3 utilisée dans les études chez le hamster, ont été administrées à des patients présentant une ICD simple ou avec des récurrences après un traitement par la vancomycine. Les résultats ont montré une persistance de la colonisation par la souche VP20621/M3 dans les selles de 44% des patients entre le 21^{ème} et le 28^{ème} jours malgré le traitement par la vancomycine (Villano *et al.*, 2012).

Un essai randomisé de phase II contrôlé par un placebo a évalué l'effet de la souche NTCD-M3 sur 168 patients avec une ICD simple ou avec des récurrences et traités par la vancomycine et/ou par le métronidazole. Les patients ont reçu différentes doses de NTCD-M3. Les résultats ont montré que le taux de récurrences était significativement plus faible dans les groupes traités par la NTCD-M3 (11%) en comparaison du groupe placebo (30%) (Gerding *et al.*, 2015). Le mécanisme exact par lequel la NTCD prévient les récurrences n'est pas entièrement établi, cependant, les auteurs suggèrent que la souche non toxigène pourrait coloniser la niche écologique avec une forte affinité, réduisant ainsi par compétition de nutriments la colonisation ultérieure par des nouvelles souches toxigènes de *C. difficile* (Gerding *et al.*, 2015).

Une étude récente a évalué l'effet de NTCD-M3 dans un modèle d'infection par *C. difficile* chez des hamsters après un traitement par la vancomycine ou par la fidaxomicine. Les auteurs ont montré que les hamsters étaient rapidement colonisés par NTCD-M3 après le traitement par la fidaxomicine et de façon stable. Les résultats équivalents sont observés pour la vancomycine (Sambol *et al.*, 2023).

Toutes ces données suggèrent que la prise d'une souche non toxigène de *C. difficile* pourrait offrir une protection contre le développement d'ICD pendant l'antibiothérapie et peut potentiellement réduire le risque de récurrence bien que son mécanisme d'action ne soit pas totalement compris.

4.2.2. FMT-derived product: Rebyota™

RBX2660 ou Rebyota™ est une suspension de microbiote préparée à partir de selles humaines conçue pour réduire le risque de récurrence des ICD. Il est prévu pour être utilisé par voie rectale et favoriserait la restauration vers un microbiote équivalent à celui d'un patient sain (Chopra, 2023). Des essais randomisés de phase II et III, contrôlés versus placebo ont démontré que le RBX2660 était bien toléré et efficace avec plus de 90% des patients présentant une guérison clinique de l'ICD pendant plus de 6 mois après le traitement par rapport au placebo (Orenstein, 2023). Le 30 novembre 2022, la FDA a autorisé l'utilisation de RBX2660 pour la prévention des récurrences des ICD chez l'adulte (Chopra, 2023).

4.2.3. Phagothérapie

Les bactériophages, également appelés phages sont des virus qui infectent spécifiquement les bactéries. Ils sont actuellement étudiés comme traitement de dernier recours dans certaines pathologies infectieuses, dont les ICD. L'avantage de l'utilisation des phages est qu'ils sont spécifiques de la bactérie et sont autorépliquatifs. De plus, les phages évoluent et développent diverses stratégies pour contrer les résistances des bactéries. Les phages possèdent deux mécanismes de réplication : le cycle lytique et le cycle lysogénique (intégration de l'ADN du phage dans le chromosome bactérien formant un prophage capable de se répliquer avec la cellule bactérienne lors de chaque division cellulaire). Il existe aussi des phages capables d'alterner entre les deux mécanismes, appelés phages tempérés. Le prophage peut devenir de nouveau actif, sortir du chromosome et déclencher une phase lytique (Fortier, 2018).

Plusieurs phages qui infectent *C. difficile* ont été identifiés comme étant des phages tempérés avec quelques-uns pouvant être utilisés comme agents thérapeutiques (Fortier, 2018). Toutefois, cela représente un inconvénient, car il a été montré que pour être utilisés comme agents thérapeutiques, les phages ne doivent pas être tempérés. En effet, Meader *et al.* ont montré que le traitement par le phage tempéré phiCD27 dans un modèle *in vitro* de

fermentation et de microbiote artificiel réduisait significativement la croissance de *C. difficile* de même que la production de TcdA et de TcdB. De plus, l'utilisation de phiCD27 ne semble pas avoir d'impact sur le microbiote (Meader *et al.*, 2010, 2013). Néanmoins, les auteurs ont montré une nouvelle croissance de *C. difficile* dans les groupes après l'arrêt du traitement, suggérant une intégration du phage dans les souches utilisées. Par ailleurs, la présence de ces prophages a conduit à la résistance de *C. difficile* à un nouveau traitement par phiCD27.

Outre la capacité des phages à lysogéniser les souches de *C. difficile*, l'utilisation d'un seul phage présente également une limite en raison de son spectre d'activité étroit à l'hôte bactérien. Il est suggéré de combiner différents phages pour s'affranchir de ces limites. En effet, Nale *et al.* ont montré *in vitro* que l'utilisation spécifique de cocktails de phages induisait la lyse complète de *C. difficile*. De plus, chez les hamsters, ces cocktails de phages ont permis de réduire la colonisation par *C. difficile* 36 heures après l'infection et d'améliorer les symptômes de l'ICD (Nale *et al.*, 2016). Ils ont par la suite optimisé ce cocktail afin d'obtenir une combinaison de quatre phages. Ils ont montré dans un modèle de fermentation que l'utilisation de ces cocktails en prophylaxie conduisait à l'éradication totale des formes végétatives de *C. difficile* en 24 heures (Nale *et al.*, 2018).

Bien que des études aient montré l'efficacité des phages pour éliminer *C. difficile* et leur spécificité à cibler cette bactérie dans la population microbienne, le cycle lysogénique des phages tempérés a entraîné des résultats peu efficaces dans le traitement des ICD (Fortier, 2018). Actuellement, aucun essai clinique utilisant les phages pour le traitement des ICD n'est en cours, car les phages identifiés ne répondent pas aux critères d'utilisation thérapeutique. Par conséquent, d'autres études cherchent à développer des phages strictement lytiques ou à utiliser uniquement des composants dérivés de ces phages tempérés comme par exemple les endolysines capables d'hydrolyser la paroi bactérienne (Heuler *et al.*, 2021).

5. Les stratégies de prévention de la survenue d'ICD

Outre les mesures de gestion du risque infectieux, la restauration du microbiote par la TMF, les LBPs et les probiotiques, des stratégies vaccinales ou visant à préserver le microbiote intestinal notamment contre l'effet des antibiotiques ont été développées ou sont en développement.

5.1. Dispositif de préservation du microbiote intestinal

Ribaxamase (SYN004)

La ribaxamase est une bêta-lactamase faiblement absorbée et développée dans le but de dégrader les antibiotiques résiduels dans le tractus gastro-intestinal c'est-à-dire les antibiotiques qui n'ont pas été absorbés ou ceux qui ont été excrétés dans l'intestin à la suite

d'un cycle entéro-hépatique. Cette approche vise à prévenir les perturbations du microbiote intestinal causés par les antibiotiques (Kaleko *et al.*, 2016). Un essai randomisé de phase IIb contrôlé versus placebo a été réalisé sur des patients traités par ceftriaxone administrée par voie intraveineuse pour des infections des voies respiratoires. Les résultats ont montré que moins de 1% des patients ayant reçu de la ribaxamase en association avec la ceftriaxone (2/207) ont développé une ICD contre 3,4% de patients (7/206) dans le groupe traité par la ceftriaxone et le placebo (Kokai-Kun *et al.*, 2019). Ces données suggèrent que la ribaxamase peut être utilisée pour le développement d'une méthode de prévention de l'ICD.

DAV132

Une autre stratégie visant à préserver le microbiote consiste à utiliser un dispositif médical appelé DAV132, développé à partir de charbon actif par le laboratoire français Da Volterra (de Gunzburg *et al.*, 2015). DAV132 contient un noyau de charbon actif enrobé d'un polymère dont la lyse est dépendante du pH. Il est conçu pour être libéré dans l'iléon distal, ce qui permet d'activer l'absorption des résidus d'antibiotiques à large spectre responsables de l'altération du microbiote intestinal, en particulier les fluoroquinolones (ciprofloxacine et la moxifloxacine) dans le cæcum et le colon (de Gunzburg *et al.*, 2015). Un essai randomisé de phase II chez des patients hospitalisés traités par des fluoroquinolones (moxifloxacine, levofloxacine ou ciprofloxacine) par voie orale ou par voie intraveineuse a montré que DAV132 était bien toléré. De plus, il permet de préserver la diversité du microbiote et la résistance à la colonisation par *C. difficile* par rapport au groupe non traité par DAV132 (Vehreschild *et al.*, 2022).

5.2. Stratégies de prévention des ICD par la vaccination

Compte tenu de la difficulté des traitements des ICD liée à la récurrence et à la persistance du pathogène dans l'environnement, il est impératif de développer des vaccins visant à offrir une protection à long terme contre l'infection et de réduire le risque de récurrence. Plusieurs approches vaccinales sont actuellement en cours de développement contre les toxines et les protéines de surface de *C. difficile*.

Stratégies vaccinales contre les toxines

Sur la base des premières données sur la réponse immunitaire de l'hôte, plusieurs candidats vaccins ciblant les toxines dans le but de prévenir le développement des symptômes de l'infection ont été proposés. L'objectif de ces vaccins est de neutraliser les effecteurs de la maladie à savoir les toxines, indépendamment de la période à laquelle surviennent les épisodes d'ICD, que ce soit lors d'un premier épisode d'ICD ou d'une récurrence. Toutefois, il est important de noter que ces vaccins n'empêchent pas la colonisation digestive par *C. difficile*. Les vaccins ayant fait ou faisant l'objet d'un essai clinique chez l'Homme sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Essais cliniques des candidats vaccins anti-toxines chez l'Homme.

Nom	Approche	Laboratoire	Statut	Référence ou N° clinical trial
Cdiffense	Vaccin bivalent toxinique	Sanofi Pasteur	Arrêté en phase III	NCT00772343 (de Bruyn <i>et al.</i> , 2021)
PF-06425090	Vaccin toxinique	Pfizer	Phase III terminée	NCT03090191 NCT03579459 (résultats non publiés)
VAL84	Protéine de fusion toxine A et toxine B tronquées	Valvena	Phase II terminée	NCT01296386 (Bézay <i>et al.</i> , 2016)

Le vaccin Cdiffense de Sanofi Pasteur contient des préparations de TcdA et TcdB inactivées au formol et administrées par voie intramusculaire. Ces toxines ont été purifiées à partir de la souche de référence de *C. difficile* VPI 10463. Des essais de phase I et II ont montré des résultats encourageants. Dans la phase II, environ 90 % des patients (âgés de 40 à 64 ans) ont montré des taux d'anticorps élevés avec une activité neutralisante lorsqu'ils ont été immunisés par trois doses (à 0, 7 et 30 jours) avec 100 µg d'antigène total. D'autre part, chez les patients plus âgés (de 65 à 75 ans) l'activité neutralisante a été approximativement de 60 % et pouvait atteindre environ 90 % après une quatrième dose au jour 180 (de Bruyn *et al.*, 2016). Cette formulation et ce calendrier de vaccination ont été adoptés dans la phase III, cependant, les essais ont été interrompus en raison d'une faible protection par le vaccin dans un objectif de prévention primaire des ICD (de Bruyn *et al.*, 2021).

Contrairement au vaccin de Sanofi, le vaccin toxinique de Pfizer (PF-06425090) est à base des toxines TcdA et TcdB dont l'activité toxinique a été réduite grâce à des substitutions d'acides aminés dans leur domaine glycosyltransférase (Donald *et al.*, 2013). Les essais de phase I se sont révélés sûrs et hautement immunogènes, générant des activités neutralisantes fortes et durables dans les groupes de personnes âgées de 40-64 ans et de 65-75 ans (Sheldon *et al.*, 2016). Pfizer a publié en mars 2022 un communiqué de presse sur les premiers résultats de la phase III (CLOVER). Le vaccin serait sûr et bien toléré avec une efficacité modérée d'environ 30% lors de l'analyse finale dans la prévention primaire de l'ICD mais il réduit significativement la durée et la sévérité de l'infection. Les résultats de cette première phase III sont en attente de publication. Ainsi, une seconde phase III est planifiée avec cette fois une modification des objectifs puisqu'il s'agit de réduire la sévérité des ICD et la survenue de récurrence mais plus une prévention du premier épisode d'ICD.

Enfin, un troisième vaccin ciblant les toxines est en essai clinique chez l'Homme. Il s'agit d'une cible de fusion entre la toxine A et la toxine B VLA84 produite par Valvena. L'approche de la protéine recombinante permet d'éviter les toxines résiduelles, qui ne sont pas complètement inactivées par les produits chimiques et de maximiser l'effet protecteur en utilisant uniquement le domaine de la toxine responsable de l'immunogénicité. Le vaccin VLA84 est bien toléré et hautement immunogène dans les essais de la phase I et II (Bézay *et al.*, 2016). Les essais cliniques de la phase III sont planifiés.

Stratégies vaccinales contre les protéines de la surface de *C. difficile*

Étant donné que *C. difficile* doit d'abord coloniser le côlon pour induire l'infection, l'idée du développement d'un vaccin dirigé contre les protéines de surface pour empêcher l'adhésion, la motilité et ainsi la colonisation par *C. difficile* a été avancée. Cette approche pourrait ainsi permettre de bloquer la multiplication de *C. difficile* et la production des toxines. De nombreuses études d'immunisation active ont été menées dans des modèles animaux et ont montré un effet plus ou moins protecteur *in vivo*, suggérant que la vaccination basée sur les protéines de surface aurait un effet protecteur dans les ICD en empêchant la colonisation par *C. difficile*. Ces études sont présentées dans la revue de Mizrahi *et al.* (Mizrahi *et al.*, 2014). Cependant, il convient de noter qu'à ce jour, aucun essai clinique n'est en cours pour évaluer ces vaccins chez l'Homme. Il pourrait être intéressant de développer un vaccin combiné ciblant à la fois les toxines et les protéines de surface, ce qui pourrait offrir une protection complète contre l'infection et éventuellement prévenir partiellement la colonisation ou la recolonisation ou même la persistance de la colonisation par *C. difficile*.

Résumé du chapitre 2

Le cycle infectieux de *C. difficile* comporte plusieurs étapes : une étape de colonisation du tube digestif par la bactérie grâce à ses facteurs de colonisation et une étape de production des toxines qui seront responsables des signes cliniques de l'infection. Les manifestations cliniques des ICD sont hétérogènes et varient d'une diarrhée simple à des formes sévères avec parfois des complications comme les colites pseudomembraneuses. De plus, il existe des cas de portage asymptomatique au sein de la population spécialement chez les nourrissons et les enfants de moins de 2 ans et plus rarement chez les adultes. L'augmentation récente de l'incidence des ICD a été associée à l'émergence de nouvelles souches « hypervirulentes. L'épidémiologie de l'infection a récemment évolué avec la description de cas communautaires d'ICD plus fréquents, associés à divers réservoirs tels les individus asymptomatiques (adultes et jeunes enfants) mais aussi les animaux, ainsi que la persistance de *C. difficile* sous forme de spores et de biofilms dans l'environnement. L'utilisation d'antibiotiques inducteurs de dysbiose du microbiote intestinal reste le facteur de risque majeur favorisant l'implantation digestive de *C. difficile* conduisant à l'infection essentiellement chez les patients les plus âgés et les plus fragiles.

Actuellement, selon les recommandations, la stratégie thérapeutique des ICD repose tout d'abord sur l'arrêt des antibiotiques inducteurs lorsque cela est possible. L'utilisation des antibiotiques ayant une activité sur *C. difficile* est recommandé pendant 10 jours. Cependant, malgré cela les ICD sont caractérisées par un taux important de récurrence. C'est pourquoi, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées notamment la neutralisation des effets cytotoxiques de ses toxines par des anticorps (bezlotoxumab), la restauration du microbiote intestinal dysbiotique (TMF, les probiotiques, etc...). Le choix de l'approche thérapeutique dépend de la sévérité de l'infection, des antécédents et des facteurs de l'hôte. Enfin, des approches de prévention sont en cours de développement tels que la préservation du microbiote intestinal par des dispositifs capables de dégrader ou absorber les antibiotiques résiduels et des stratégies de vaccination visant à prévenir l'infection primaire ou son évolution vers des formes sévères.

Dans le chapitre 3, nous examinerons en détail le rôle central à la fois du microbiote intestinal ainsi que les conséquences associées à la dysbiose induite par les antibiotiques mais aussi de la réponse immune de l'hôte contre *C. difficile*.

Chapitre III : les facteurs influençant la dynamique de colonisation digestive par *Clostridioides difficile*

A. Etat d'eubiose

1. Le microbiote intestinal

1.1. Généralités

Un microbiote est une communauté complexe de microorganismes : virus, archées, bactéries, parasites et champignons présents dans un environnement. L'ensemble de leurs génomes et fonctions associées constitue le microbiome (Marchesi *et al.*, 2016).

Il existe différents microbiotes chez les humains dont la composition peut être très différente en termes d'abondance et de diversité selon leur localisation anatomique notamment au niveau de la peau, dans la cavité orale et au site urogénital avec une densité microbienne plus importante au niveau du tube digestif (Figure 28).

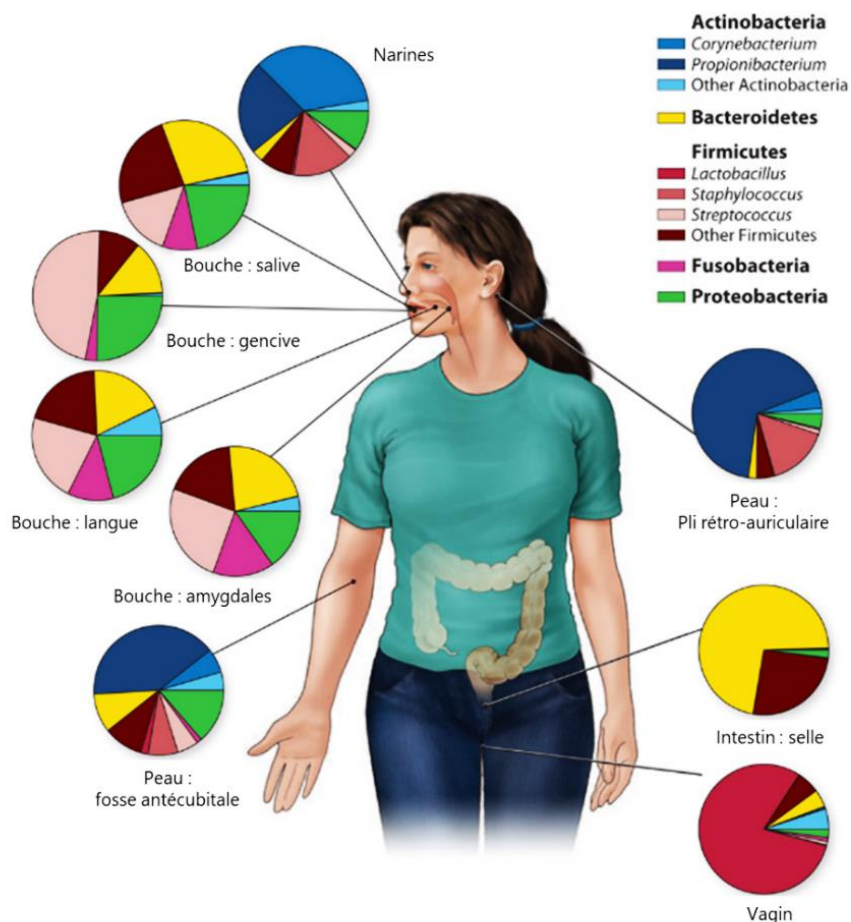


Figure 28 : Répartition des principaux phylums du microbiote en fonction des différents sites de l'organisme humain.

Adaptée de (Grice and Segre, 2012).

Le tube digestif représente la plus grande interface (comprise entre 250 et 400 m², comparable à la surface d'un terrain de tennis) entre l'hôte et le milieu extérieur (Bengmark, 1998). Il contient 10 fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines représentant environ 10¹⁴ cellules. L'ensemble des gènes identifiés au sein de ces microbiotes est plus de 20 millions en comparaison des 20-23000 gènes humains. Le potentiel génétique du microbiote est donc très important (Rinninella *et al.*, 2019). Une étude en 2016 a réévalué en modérant ce rapport entre les bactéries et les cellules humaines à 1:1 avec 3,8.10¹³ bactéries pour 3.10¹³ cellules humaines chez un Homme avec un poids corporel de 70 kg (Sender *et al.*, 2016).

Ces bactéries ont co-évolué avec leur hôte afin d'établir une relation mutuellement bénéfique pour l'un et l'autre (Bäckhed *et al.*, 2005). Les microbiotes peuvent également héberger des pathogènes opportunistes qui en cas de perturbation de l'écosystème microbien peuvent induire des pathologies.

Le microbiote intestinal offre de nombreux avantages à l'hôte de part un grand nombre de fonctions métaboliques et physiologiques dont le renforcement et le maintien de l'intégrité intestinale, la formation de l'épithélium intestinal, la résistance à la colonisation par les pathogènes extérieurs et la mise en place et la régulation de l'immunité de l'hôte. L'interaction entre l'hôte et le grand nombre de microorganismes présents le qualifie de « super organisme » (Gill *et al.*, 2006).

Depuis longtemps, le microbiote intestinal de l'hôte a suscité de nombreux intérêts dans son implication dans différentes maladies dont les maladies métaboliques, les cancers, les maladies inflammatoires de l'intestin ou encore l'obésité. Sa caractérisation permet de mieux comprendre son interaction avec l'hôte avec des perspectives dans le diagnostic mais également l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques dont l'utilisation des probiotiques et de la TMF décrites dans le chapitre 2 – traitement. Par ailleurs, une meilleure compréhension de son rôle est également importante dans le contexte de l'évolution vers une médecine personnalisée.

1.2. Les différentes méthodes d'étude du microbiote intestinal

La complexité de la composition du microbiote rend son étude difficile. Il existe plusieurs méthodes anciennes et nouvelles qui permettent d'analyser l'abondance et la composition du microbiote. Les principales méthodes sont la culture bactérienne et les méthodes moléculaires indépendantes de la culture, dont l'analyse ciblant certaines espèces ou certains gènes d'intérêt et le séquençage haut débit de l'ensemble des génomes présents au sein du microbiote.

La plupart de ces méthodes ont été appliquées à l'étude du microbe digestif qui réside au niveau de la muqueuse colique puisqu'il contient la densité la plus élevée en bactéries. De plus, il est relativement simple d'obtenir de la matière fécale qui permet d'estimer ce qui se passe

globalement dans l'organisme mais ces données ne représentent pas précisément ce qui se passe au niveau des différents étages du tube digestif.

La culture bactérienne

Elle représente la méthode la plus ancienne pour l'analyse du microbiote. Elle est plus simple, à coût abordable et relativement la plus utilisée en routine pour le diagnostic microbiologique dans les laboratoires de ville ou hôpital pour l'identification de pathogènes dans les prélèvements cliniques ou pour la recherche de bactéries résistantes ou multirésistantes aux antibiotiques. Bien qu'elle soit la méthode la plus utilisée, on estime que plus de 70% des espèces du microbiote n'ont pas de représentant cultivable (Almeida *et al.*, 2021). Les conditions de culture au laboratoire fournissent un environnement moins favorable à la croissance de certaines bactéries du microbiote. La plupart des bactéries du microbiote intestinal sont des espèces bactériennes anaérobies strictes ce qui rend difficile leur culture au laboratoire. En effet, les laboratoires ne peuvent pas toujours assurer le maintien permanent des conditions anaérobies ce qui compromet notamment l'isolement des bactéries catégorisées d'EOS « *Extremely oxygene sensitive* ». D'autre part, la croissance des bactéries prédominantes dans les selles compromet l'isolement des bactéries sous dominantes dans un prélèvement par définition polymicrobien (Walker *et al.*, 2014).

Les méthodes moléculaires

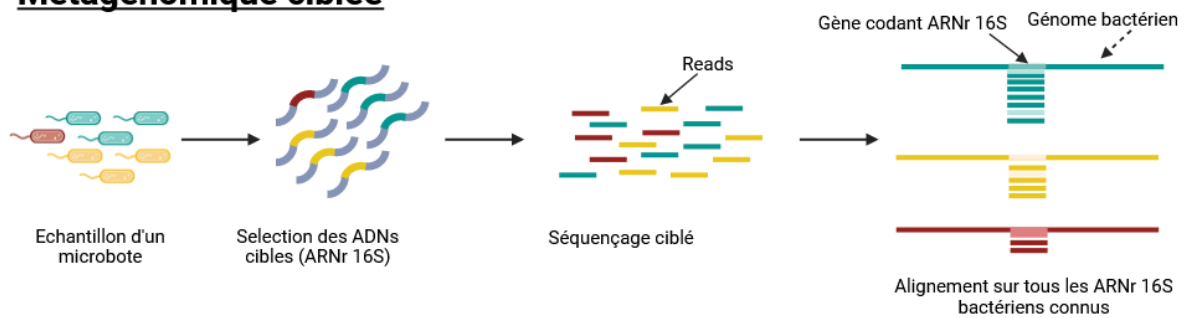
Depuis quelques dizaines d'années, des progrès ont été réalisés en termes de séquençage haut-débit permettant de séquencer un grand nombre de fragments d'ADN. De même, l'évolution de l'analyse bio-informatique a permis de généraliser l'approche moléculaire et ainsi compléter et enrichir les données de culturomique. Ces méthodes moléculaires permettent de s'affranchir de la nécessité de la culture et de décrire exhaustivement les écosystèmes du microbiote et d'en préciser la diversité et la richesse.

L'étude de la communauté microbienne par des méthodes indépendantes de la culture se base principalement sur deux méthodes :

1) la métagénomique ciblée c'est-à-dire sur un gène cible ubiquitaire chez les organismes à étudier comme par exemple le séquençage haut débit d'un fragment du gène codant l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) qui est considéré comme le marqueur phylogénétique le plus conservé parmi les procaryotes (Figure 29).

2) la métagénomique globale ou « *shotgun* » qui consiste au séquençage haut-débit de l'ADN de tous les organismes contenus dans l'échantillon.

Métagénomique ciblée



Métagénomique globale (Shotgun sequencing)

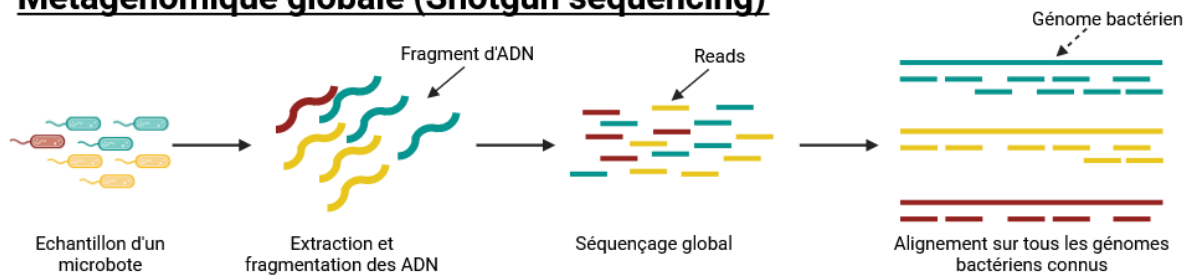


Figure 29 : Représentation de l'analyse du microbiote par la métagénomique ciblée (basé sur le gène codant l'ARN ribosomal 16S) ou par la métagénomique globale ou "Shotgun".

Créée avec BioRender.com

1.2.1. La métagénomique ciblée

L'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) fait partie de la structure de la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien. L'ARNr 16S possède un peu moins de 1500 paires de bases et est constitué de neuf régions variables selon les espèces (V1-V9) qui sont séparées les unes des autres par des régions conservées entre les espèces (Figure 30).

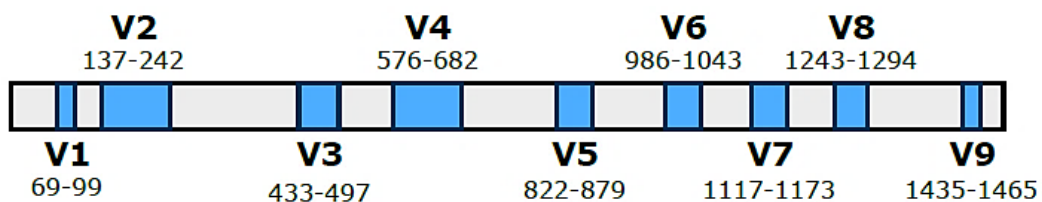


Figure 30 : Schéma représentatif de l'ADNr 16S des procaryotes

Les régions conservées sont représentées en gris et les régions variables (V1-V9) en bleu. D'après la thèse de Léa Siegwald (Siegwald, 2017).

L'ARNr 16S est considéré comme la carte d'identité des bactéries puisqu'il permet d'identifier les différentes espèces bactériennes en se basant sur les régions variables notamment V3-V4, V4-V6 et V6-V8 et d'étudier leurs relations phylogénétiques en se basant sur les régions conservées (Combrink *et al.*, 2023).

Nous allons nous intéresser au profilage du microbiote par analyse de l'ADNr 16S puisqu'il a été utilisé dans cette thèse.

Les principales étapes du profilage du microbiote par le séquençage de l'ADNr 16S

Le profilage du microbiote intestinal basé sur le gène codant l'ARNr 16S comporte plusieurs étapes dont la préparation des échantillons, l'extraction de l'ADN génomique total, le séquençage suivi de l'analyse bio-informatique permettant d'assigner les taxons bactériens et d'évaluer la composition du microbiote en termes de richesse et de diversité.

L'étape de la préparation des échantillons est cruciale. Il est important de réaliser les prélèvements dans des conditions stériles afin de limiter les contaminations des échantillons par de l'ADN exogène. Par ailleurs, les échantillons prélevés doivent être conservés dans des tampons de conservation comme par exemple ceux de dispositif utilisés souvent pour collecter les échantillons (FecalSwab « *Fecal transport swab* » ou SPD « *Stool preprocessing device* ») et stocker afin de « figer » la composition du microbiote et d'éviter la perte des bactéries anaérobies strictes ainsi que la dégradation des acides nucléiques (Tedjo *et al.*, 2015; Elie *et al.*, 2023). Le choix de la méthode de préservation du prélèvement dans un tampon de conservation peut introduire une variabilité importante dans les résultats de l'analyse du microbiote.

Des kits sont commercialisés pour l'extraction de l'ADN total, cependant, il peut y avoir des biais d'extraction en fonction des méthodes adoptées dans les kits à savoir l'inclusion ou non d'une lyse mécanique et le type de lyse chimique (Sinclair *et al.*, 2023; Elie *et al.*, 2023). Ceci représente un enjeu important, puisque les méthodes utilisées introduisent des variabilités pour la comparaison des données du microbiote entre les études. Il est donc important d'appliquer les mêmes conditions pour chaque échantillon analysé afin d'éviter les effets de lot au sein d'une même étude.

Une fois l'extraction de l'ADN génomique total et le séquençage d'une région de l'ADNr 16S réalisé par Illumina Miseq (méthode de séquençage la plus utilisée), le fichier contenant l'ensemble des séquences est traité par bio-informatique. Après plusieurs étapes comprenant le filtrage et le « nettoyage » des données, les séquences sont regroupées en unité opérationnelle taxonomique (OTU « *operational taxonomic units* ») ou en variant de séquence d'amplicons (ASV « *amplicon sequence variants* ») puis sont assignées au nom des bactéries. Il existe plusieurs stratégies pour réaliser ces étapes qui vont utiliser des pipelines tels que

mothur (Schloss *et al.*, 2009), UPARSE (Edgar, 2013), QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) et FROGS (Escudié *et al.*, 2018a). La base de donnée d'affiliation qui est régulièrement mise à jour et la plus utilisée est SILVA, une base de données de référence d'ADNr 16S bactérien (Combrink *et al.*, 2023).

La diversité au sein du microbiote peut être mesurée par différentes méthodes. Plusieurs indices de diversité peuvent être utilisés pour l'analyse de la diversité au sein des microbiotes, intégrant ou non l'abondance relative et le nombre de taxons identifiés dans chaque échantillon, ainsi que la phylogénie (Goodrich *et al.*, 2014). On utilise la diversité α , qui correspond à la diversité présente au sein d'un échantillon et la diversité β , qui permet de mesurer les différences entre deux écosystèmes. Les indices les plus utilisés pour décrire la diversité α sont l'indice Chao1 (mesure la richesse taxonomique), l'indice de Shannon (mesure l'abondance relative du taxon dans l'échantillon), l'indice de Simpson (rapporte à l'uniformité la distribution des taxons). En ce qui concerne la diversité β , les indices les plus utilisés sont Bray-Curtis, Jaccard, UniFrac et wUniFrac (Goodrich *et al.*, 2014).

Il est important de noter que les choix effectués à chaque étape, de la conception de l'étude à l'analyse peuvent introduire des biais dans l'analyse ce qui aura pour conséquence de faire varier le nombre de séquences obtenues influençant ainsi la détermination des OTU. De même, la base de données sélectionnée pour l'affiliation est importante. En particulier lors des changements taxonomiques comme par exemple le changement de nom des lactobacillus (*Lactobacillus casei* qui devient *Lacticaseibacillus casei*) (Zheng *et al.*, 2020).

1.2.2. La métagénomique globale

La métagénomique globale ou « *Shotgun sequencing* » consiste au séquençage haut-débit de l'ADN qui permet l'analyse du potentiel génétique d'un écosystème dans sa globalité sans se focaliser sur le marqueur génétique tels que le gène codant l'ADNr 16S (Figure 29). Un des avantages de la métagénomique globale est qu'elle permet d'identifier plus précisément les bactéries, car il est souvent possible de caractériser ces bactéries au niveau de l'espèce, voire de la souche, tandis que la méthode basée sur le profilage du gène codant l'ARNr 16S ne décrit qu'au niveau du genre et que très rarement au niveau de l'espèce. La limite dans les deux cas est la richesse des bases de données disponibles. La métagénomique globale semble être l'approche la plus efficace pour générer des génomes complets, qu'ils soient grands ou petits, en grande partie grâce aux progrès de l'informatique (Thomas *et al.*, 2012).

Outre la description du potentiel génétique global par la métagénomique, d'autres méthodes viennent s'ajouter afin de décrire les fonctions du microbiote intestinal via le séquençage massif de tous les ARN (métatranscriptomique), la caractérisation de l'ensemble des protéines

(métabotéomique) ou de l'ensemble des métabolites (métabolomique) retrouvés au sein d'un microbiote.

Autres méthodes de profilage basées sur l'ARNr 16S

D'autres méthodes que le séquençage permettent d'étudier la diversité des microbiotes basées sur l'utilisation de l'ARNr 16S. On retrouve notamment la PCR « *Polymerase Chain Reaction* » qui peut être quantitative (qPCR) ou non, la TTGE ou la DDGE « *Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis* » ou encore l'hybridation *in situ*. Ces méthodes comportent des étapes préliminaires d'extraction et de purification de l'ADN génomique total.

- L'amplification par PCR

Elle repose sur l'amplification d'une portion d'un gène avec les amorces spécifiques dessinées pour cibler une ou plusieurs espèces. Elle permet la quantification des différentes espèces d'intérêt et de comparer les échantillons. Elle est utile et rapide pour des analyses d'une partie du microbiote sur des espèces cibles d'intérêt. Cependant, elle n'est pas adaptée à l'analyse globale du microbiote intestinal.

- DDGE et TTGE « *Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis* »

Elle est basée sur la migration sur un gel de polyacrylamide avec un gradient dénaturant (DDGE) de l'ADN (mélange d'urée et de formamide) ou un gradient de température (TTGE) d'un produit de PCR préalablement amplifiés avec des amorces ciblant également un groupe d'espèces bactériennes présentant en plus des extrémités riches en GC appelé « *GC-clamp* ». Les fragments riches en GC migreront plus loin pour créer un motif de bandes distinctes qui représentent la quantité de diversité dans l'échantillon. Cette technique permet de comparer les fractions dominantes d'une population bactérienne (Muyzer and Smalla, 1998).

1.3. Structure et composition des bactéries dans le tube digestif

Les bactéries sont classées par le phylum, la classe, l'ordre, la famille, le genre, l'espèce et enfin les souches. L'analyse du métagénome du microbiote par les projets HMP « *Human Microbiome Project* » et MetaHit a permis de dresser une vue globale de la composition du microbiote intestinal humain. Selon ces données, chez un individu sain, le microbiote intestinal est composé de plus de 2000 espèces classées dans 12 phylums. Parmi eux, on retrouve quatre phylums majoritaires : les Firmicutes (60-80%) et les Bacteroidetes (20-40%), de même que les Protéobactéries et les Actinobactéries qui sont les moins représentés (Hugon *et al.*, 2015). Ces quatre phylums représentent plus de 90 % de la composition du microbiote intestinal. Leur proportion et leur composition diffèrent d'un individu à un autre suggérant une spécificité du microbiote pour chaque individu (Rinninella *et al.*, 2019). En 2021, il a été proposé une nouvelle

nomenclature pour les phylums des procaryotes, Bacillota (ex Firmicutes), Bacteroidota (ex Bacteroidetes), Pseudomonadota (Proteobacteria) et Actinomycetes (ex Actinobacteria). Toutefois, les bases de données n'ont pas encore été mises à jour ce qui fait que la nomenclature ancienne est toujours utilisée (Oren and Garrity, 2021).

Les Firmicutes se divisent en 2 classes de bactéries Gram positif : les Clostridia (principalement *Clostridium cluster IV* et *Clostridium cluster XIVa*) et les Bacilli (*Bacillales* et *Lactobacillales*).

Les Bacteroidetes regroupent la majorité des bactéries Gram négatif et se divise en 2 genres principaux : *Bacteroides* et *Prevotella* (Figure 31).

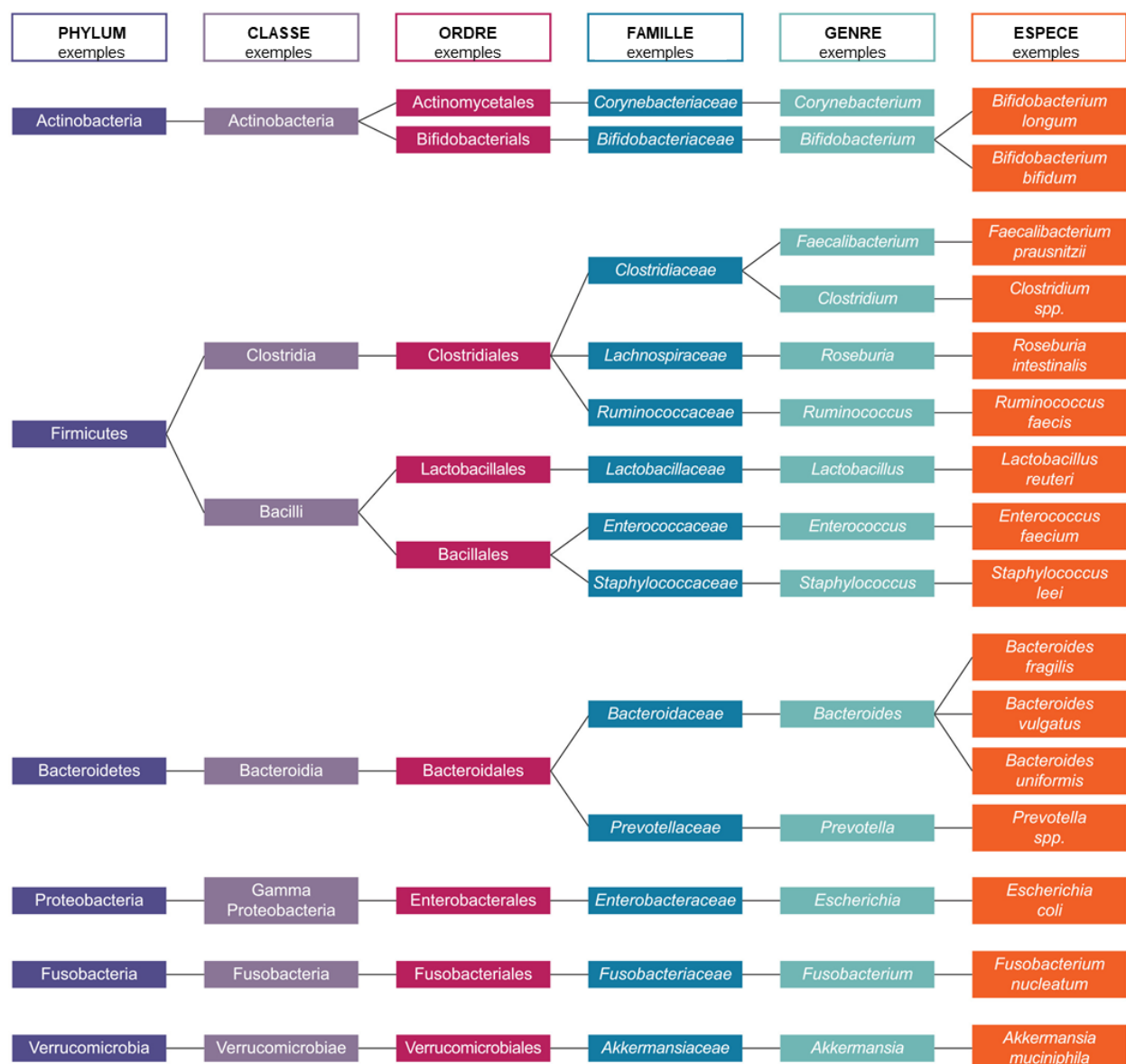


Figure 31: Composition du microbiote intestinal d'un individu sain.

D'après (Seekatz *et al.*, 2022).

Par ailleurs, la diversité du microbiote varie tout au long du tube digestif (Figure 32). De l'estomac au côlon, on observe une augmentation de la quantité de bactérie qui va de 10^1 à 10^3 UFC/mL dans l'estomac et le duodénum, 10^4 à 10^7 UFC/mL dans le jéjunum et l'iléon jusqu'à une densité beaucoup plus importante de 10^{11} à 10^{12} UFC/mL dans le côlon (O'Hara and Shanahan, 2006).

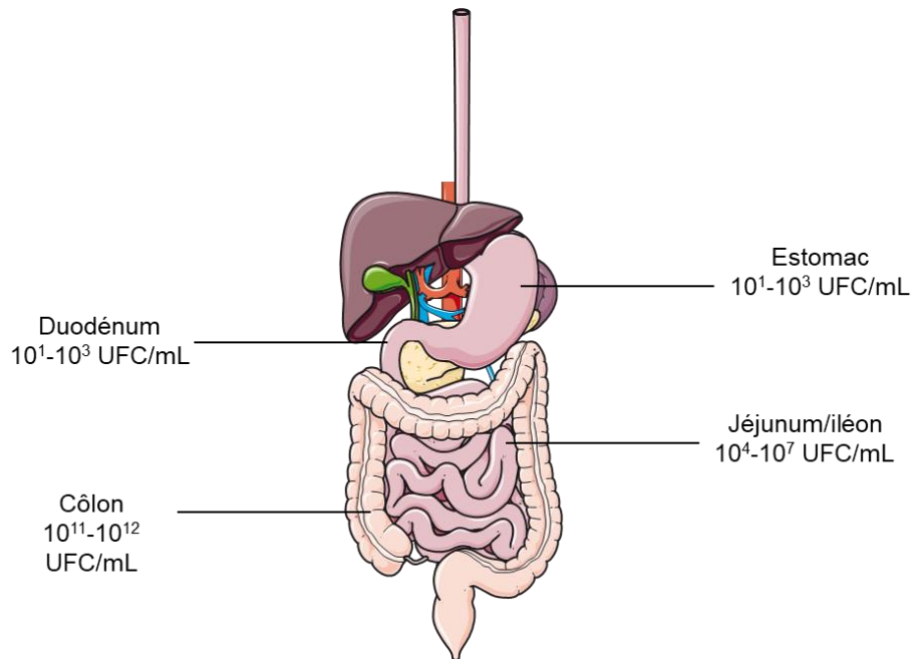


Figure 32: Variation de la composition du microbiote intestinal tout au long du tube digestif.

Adaptée de (O'Hara and Shanahan, 2006).

Cette diversité de la densité et de la distribution des bactéries dépend de différentes conditions du milieu où elles se trouvent notamment la teneur en oxygène, du pH, de l'alimentation et la présence du mucus (Rinninella *et al.*, 2019). Peu de bactéries sont capables de résister à l'acidité et à l'oxygène de l'estomac, ainsi, la majorité des bactéries sont retrouvés au niveau de la muqueuse intestinale du colon.

Une étude réalisée par Frank *et al.* montre que les espèces colonisant l'intestin grêle ne sont pas différentes de celles du côlon. Comme indiqué plus haut, le microbiote est dominé par les Firmicutes et les Bacteroidetes, seule la proportion des espèces de ces phylums change en fonction des conditions. Les auteurs ont retrouvé des *Bacillus* (principalement *Lactobacillales*) plus abondants dans l'intestin grêle que dans le côlon (Frank *et al.*, 2007). En revanche, divers membres du phylum Bacteroidetes et des *Lachnospiraceae* du phylum Firmicutes étaient moins abondants dans l'intestin grêle (Frank *et al.*, 2007).

En plus de cette variabilité tout au long du tube digestif, le microbiote intestinal varie également localement dans l'intestin. En effet, l'épithélium intestinal est séparé de la lumière

intestinale par une couche de mucus épaisse qui constitue une barrière et une première ligne de défense contre les bactéries pathogènes. Le microbiote présent dans la lumière intestinale diffère significativement de celui retrouvé au niveau de la couche de mucus où sont observés plus de bactéries anaérobies strictes (Swidsinski *et al.*, 2005).

1.4. Les différentes fonctions du microbiote intestinal

Malgré la diversité interindividuelle du microbiote, les fonctions du microbiote sont globalement conservées entre les individus. Ces microorganismes offrent de nombreux avantages à l'hôte par un grand nombre de fonctions physiologiques dont le renforcement et le maintien de l'intégrité intestinale, la formation de l'épithélium intestinal, la résistance à la colonisation par les microorganismes pathogènes ainsi que le développement et la maturation du système immunitaire de l'hôte. Les différentes fonctions du microbiote intestinal peuvent être regroupées en fonctions métaboliques et en fonctions de barrière et de protection (Figure 33).

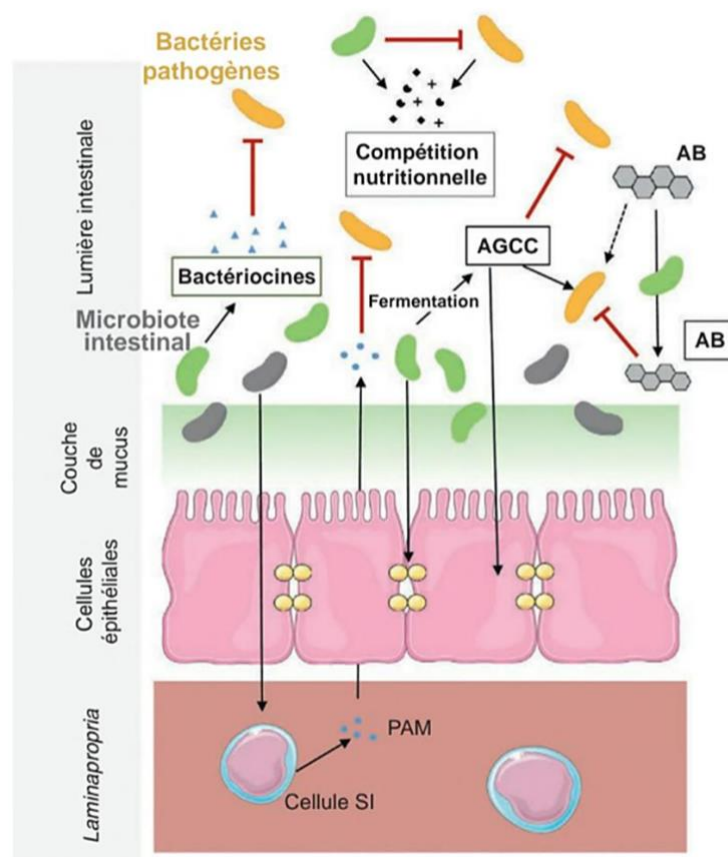


Figure 33 : Les différents mécanismes de résistance à la colonisation du microbiote intestinal.

AB : acides biliaires ; AGCC : acides gras à chaîne courte ; PAM : peptide antimicrobien ; SI : système immunitaire.

D'après (Lecerf and Delzenne, 2021).

1.4.1. Les fonctions métaboliques du microbiote

Il existe un lien important entre le microbiote de l'hôte, la digestion et le métabolisme. La diversité génétique du microbiote intestinal permet de digérer des composés par des voies métaboliques qui ne sont pas codées dans le génome de l'hôte. Différents groupes bactériens participent au métabolisme des glucides, des gaz, des protéines et des lipides.

Une fonction importante des bactéries du microbiote est d'exprimer des enzymes qui peuvent métaboliser les glucides comme les celluloses, les hémicelluloses, les pectines, les oligosaccharides en acides gras à chaîne courte (AGCC) comme l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces AGCC sont rapidement absorbés par les cellules épithéliales où ils participent à la régulation des processus cellulaires comme l'expression des gènes, le chimiotactisme, la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la génération de sources d'énergies. Ces AGCC sont produits par la plupart des Firmicutes (butyrate), des Bacteroidetes (propionate), et plus généralement les bactéries anaérobies du microbiote (acétate) (Morrison and Preston, 2016).

Outre le métabolisme des glucides, certaines bactéries du microbiote, dont les *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.*, participent au métabolisme des protéines qui représente la principale source d'azote dans le côlon. Ces bactéries possèdent une activité protéasique permettant d'hydrolyser les protéines en petits peptides qui seront métabolisés en acides aminés libres utilisés par les autres bactéries qui ne peuvent pas assimiler les peptides (Adak and Khan, 2019).

Par ailleurs, les bactéries du microbiote interviennent également dans la biosynthèse des vitamines, le métabolisme des xénobiotiques, le métabolisme des lipides, la régulation des acides biliaires, le métabolisme de certains acides aminés comme l'arginine, la lysine, le glutamate et l'aspartate (Adak and Khan, 2019). La biosynthèse des acides biliaires et leur implication dans la physiopathologie des infections à *C. difficile* seront détaillées dans les paragraphes dédiés.

1.4.2. Les fonctions de barrière et de protection du microbiote

L'effet protecteur du microbiote est à la fois vis-à-vis des bactéries pathogènes exogènes mais aussi des bactéries pathogènes opportunistes endogènes qui peuvent devenir délétères en cas de perturbation du microbiote. Les mécanismes de l'effet barrière reposent tout d'abord sur une barrière physique représentée par l'épithélium intestinal et la couche de mucus et une barrière chimique constituée par les peptides antimicrobiens dont les défensines, excrétées par les cellules épithéliales. Une barrière cellulaire complète l'ensemble avec le système de l'immunité innée et adaptative en particulier la stimulation de la biosynthèse et la sécrétion des immunoglobulines A sécrétoires (IgAs) pour renforcer les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, inhiber l'adhésion des microorganismes et neutraliser l'activité cytotoxique

des toxines. La stimulation du système immunitaire par le microbiote sera détaillée dans le paragraphe dédié.

La couche de mucus

La couche de mucus est constituée de glycoprotéines de mucines sécrétées par les cellules caliciformes de l'hôte et assemblées en une couche visqueuse couvrant le tube digestif dans l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin. Sa composition et son épaisseur varient tout au long du tube digestif avec une couche plus épaisse au niveau du gros intestin. Elle est composée d'une fine couche interne stérile à la surface des cellules épithéliales et d'une couche externe où sont localisées les bactéries anaérobies commensales (Figure 34). La couche de mucus offre ainsi une niche écologique importante pour le microbiote intestinal.

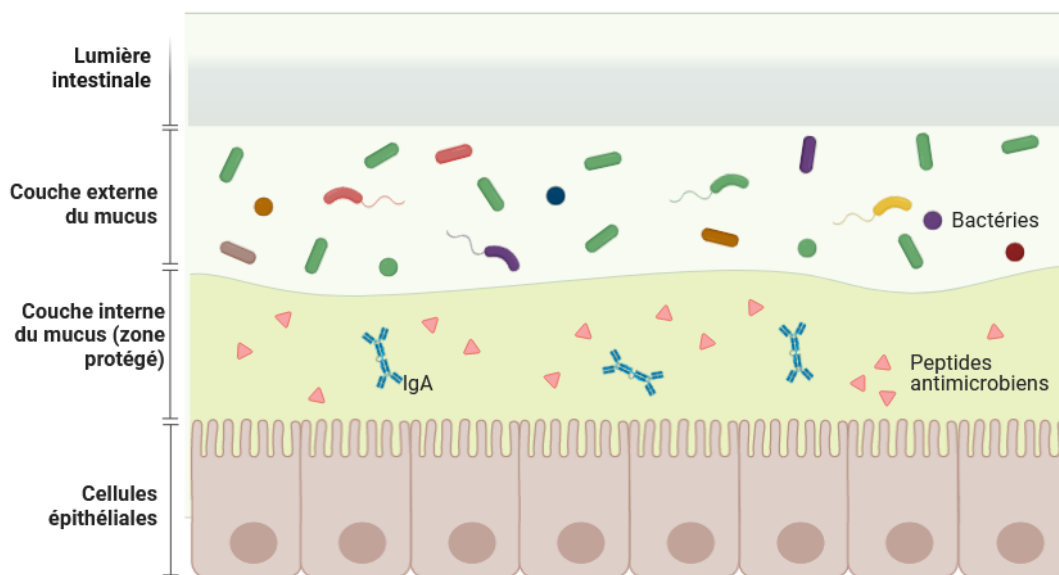


Figure 34 : Fonction barrière de la muqueuse intestinale

Epithélium intestinal constitué de cellules épithéliales recouvertes d'une couche de mucus sécrétée. La couche de mucus est séparée en deux couches, une couche interne stérile (sans bactéries) et une couche externe où sont retrouvées les bactéries du microbiote. Les peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales et les IgA sécrétoires produites par les cellules B vont pénétrer la couche de mucus et contribuer à l'élimination des pathogènes. Créée avec BioRender.com

De par sa fonction de barrière, la couche de mucus empêche le contact direct des cellules épithéliales avec les bactéries du microbiote contenues de la lumière intestinale et les enzymes digestives (McGuckin *et al.*, 2011). Les mucines produites (principalement MUC2) dans le mucus sont faiblement dégradées par les bactéries et par les protéases de l'hôte ce qui leur permet d'empêcher l'adhésion des bactéries commensales et pathogènes opportunistes à la surface des cellules épithéliales (Johansson *et al.*, 2008). Outre l'effet barrière, les mucines sont des

sources de de carbone, d'azote et d'énergie pour certaines bactéries du microbiote comme *Akkermansia muciniphila*. Il a été montré que *A. muciniphila* est capable de dégrader la mucine en propionate et en acétate (Derrien *et al.*, 2004; Lukovac *et al.*, 2014). Les métabolites résultants sont donc utilisés par l'hôte et d'autres bactéries du microbiote qui ne possèdent pas cette fonction pour leur croissance. Ainsi, *A. muciniphila* et d'autres bactéries qui dégradent la mucine comme *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Bifidobacterium bifidum* participent au renouvellement et au maintien de cette barrière protectrice (McGuckin *et al.*, 2011).

Toutefois, les bactéries ont su évoluer et développer des mécanismes capables de franchir la barrière de mucus grâce à leurs flagelles comme *Helicobacter pylori* et *Campylobacter spp.* Par ailleurs, des bactéries comme *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* peuvent également produire des enzymes capables de dégrader le mucus dont des glycosidases qui dégradent les oligosaccharides des mucines et par conséquent leur permettent d'atteindre les cellules épithéliales. Des bactéries pathogènes dont *C. difficile* et *S. flexneri* peuvent aussi altérer indirectement les cellules épithéliales par la production de toxines et par conséquent contourner la fonction barrière du mucus (McGuckin *et al.*, 2011).

Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs « *Antimicrobial peptides* » ou HDP « *Host defense peptides* ») sont des petits peptides (entre 12-50 acides aminés) produits par une grande variété de bactéries, de plantes, de vertébrés et d'invertébrés et de champignons (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). On distingue deux principales familles d'AMPs chez les mammifères : les défensines (subdivisées en α , β ou ω -défensive) et les cathélicidines. Les AMPs sont des antimicrobiens à large spectre actifs contre les bactéries, les virus et les champignons. Ils sont impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire. De plus, ils possèdent des activités anti-cancéreuses et de cicatrisation des plaies (Huan *et al.*, 2020). En réponse à une invasion par des bactéries pathogènes par exemple, les bactéries commensales du microbiote vont renforcer le système immunitaire en stimulant la sécrétion des AMPs dans la couche de mucus majoritairement par les cellules de Paneth (Figure 33 et Figure 34) (Bevins and Salzman, 2011).

1.5. Le développement du microbiote intestinal

Le développement du microbiote débute dès la naissance suggérant que le nouveau-né était stérile *in utero*. Cependant, des études ont montré que le placenta, le cordon ombilical et le liquide amniotique contiennent des microorganismes (Jiménez *et al.*, 2005; DiGiulio *et al.*, 2008; Stout *et al.*, 2013; Aagaard *et al.*, 2014). Ces études évoquent que le microbiote se développerait déjà durant la vie fœtale. Cependant, cette hypothèse reste à ce jour très controversée en raison des modalités de prélèvement des échantillons analysés.

Il a été montré que la voie de naissance, par voie basse ou par césarienne, peut influencer les premières étapes de la mise en place du microbiote du nourrisson. Les nouveau-nés nés par voie basse auront un premier contact avec le microbiote vaginal et périnéal de la mère essentiellement composé de *Lactobacillus spp.* et de *Bifidobacterium spp.* (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Néanmoins, pendant les premiers jours de leur vie, leur microbiote sera enrichi en *Lactobacillus spp.* reflétant le microbiote vaginal de la mère (Aagaard *et al.*, 2012; Avershina *et al.*, 2014). Le microbiote intestinal des nouveau-nés nés par voie basse ressemble à 72% à celui de la mère contrairement à la naissance par césarienne qui n'est plus similaire qu'à 41% (Bäckhed *et al.*, 2015). En effet, le nouveau-né né par césarienne sera tout d'abord en contact avec les bactéries de la peau de la mère, du personnel soignant et de l'environnement de l'hôpital et non avec le microbiote vaginal de la mère comme lors d'un accouchement par voie basse. Par conséquent, les nouveau-nés nés par césarienne ont un retard dans la colonisation par les *Bacteroides* et les *Bifidobacterium spp.* mais seront principalement colonisés les bactéries anaérobies facultatives comme les *Clostridium stricto sensu* (Jakobsson *et al.*, 2014; Milani *et al.*, 2017).

Outre la voie de naissance, le terme de l'accouchement peut également influencer la mise en place du microbiote du nouveau-né. Il a été montré que les enfants prématurés présentent un intestin immature et par conséquent ont des problèmes immunitaires, respiratoires et neurologiques. Tout comme les enfants nés par césarienne, les enfants prématurés auront un retard dans la colonisation par les *Bacteroides* et les *Bifidobacterium spp.* Leur microbiote est majoritairement dominé par les *Staphylococcus*, les *Enterococcus* et les *Clostridia* (Milani *et al.*, 2017).

Le mode d'alimentation (allaitement ou formule infantile en poudre) peut également influencer l'établissement du microbiote chez le nouveau-né. L'allaitement va favoriser la croissance des Actinobactéries dont les *Bifidobacterium spp.* mais aussi les *Bacteroides spp.* par la digestion des oligosaccharides contenus dans le lait maternel appelé HMOs « *Human milk oligosaccharides* » (Bezirtzoglou *et al.*, 2011; Marcobal *et al.*, 2011). La diversification alimentaire va enrichir le microbiome de métaboliseurs de polysaccharides et de vitamines (Bäckhed *et al.*, 2015).

Développement du microbiote dans les trois premières années de vie

D'autres facteurs comme l'environnement direct et le contact avec le microbiote des adultes qui l'entourent vont également influencer la mise en place du microbiote du nourrisson. A la naissance, le nouveau-né est plongé dans un environnement bactérien riche. Il est rapidement colonisé par la plupart des bactéries auxquelles il est exposé ce qui induit une modification de la composition de son microbiote.

Durant les premiers mois de la vie, le microbiote intestinal est caractérisé par une faible diversité et est dominé par deux phylums : les Protéobactéries et les Actinobactéries. Pendant les premiers jours de vie, on observe une diversité bêta plus élevée qui commence à baisser à l'âge de 12 mois contrairement à l'alpha diversité qui augmente en cours du temps (Figure 35) et qui tend vers celui des adultes dominés par les Firmicutes et les Bacteroidetes (Eckburg *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2007). Ceci indique que le microbiote du nourrisson devient plus complexe au fil du temps, pendant que la diversité interindividuelle diminue progressivement pour atteindre celle des adultes.

Autour de l'âge de 3 ans, la composition, la diversité et les fonctions du microbiote deviennent stables et ressemblent à celui de l'adulte (Derrien *et al.*, 2019). Par conséquent, le développement du microbiote intestinal pendant les trois premières années de la vie est crucial et peut impacter la santé et le développement de l'enfant.

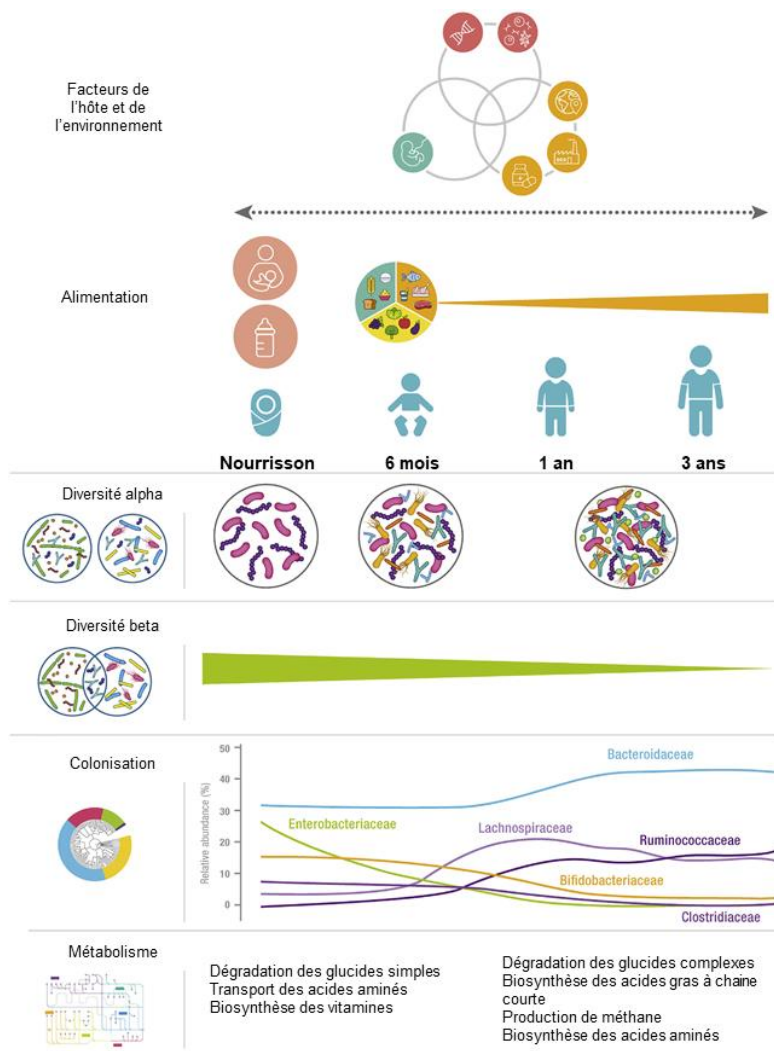


Figure 35 : Développement du microbiote dans les 3 premières années de vie.

La diversité alpha et la complexité fonctionnelle augmentent avec l'âge, tandis que les variations interindividuelles (diversité bêta) diminuent.

Adaptée de (Derrien *et al.*, 2019).

1.6. Les facteurs qui influencent la composition du microbiote intestinal

Une fois établi, le microbiote intestinal est relativement stable dans le temps bien qu'il soit variable entre les individus. Toutefois, plusieurs facteurs environnementaux et de l'hôte peuvent induire des changements importants dans la communauté microbienne.

Comme décrit plus haut, des études ont montré que le régime alimentaire peut augmenter et réduire la diversité et la richesse du microbiote intestinal depuis la naissance. Le régime alimentaire peut être influencé par la région géographique. Par exemple les enfants vivant en Afrique (Burkina Faso) auront un régime alimentaire riche en fibre et en polysaccharides des plantes alors que les enfants vivant en Europe auront un régime alimentaire riche en sucres et en protéines animales. Au final, on observe une prédominance des Actinobactéries et des Bacteroidetes plus importante chez les enfants vivants au Burkina Faso (De Filippo *et al.*, 2010).

A l'âge adulte, le régime alimentaire végétarien favorise la dominance des Firmicutes et des Bacteroidetes alors qu'un régime alimentaire riche en protéines va favoriser l'abondance des *Bacteroides* et *Alistipes* avec une diminution des Firmicutes. Par ailleurs, un régime riche en fibres va favoriser le maintien de l'intégrité de la barrière mucoale (David *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2018).

D'autre part, le microbiote intestinal est influencé par l'âge. Il a été montré que le microbiote d'une personne âgée de plus de 65 ans présente une abondance relative riche en Bacteroidetes et en *Clostridium* cluster IV (*Faecalibacterium spp.*) par rapport au microbiote d'un jeune adulte qui est riche en *Clostridium* cluster XIV (Claesson *et al.*, 2011). Par ailleurs, chez les personnes âgées, il a été observé une forte diminution des *Bifidobacterium spp.* impliquées dans le métabolisme des AGCC et une abondance de pathogènes opportunistes par rapport aux sujets plus jeunes (Woodmansey *et al.*, 2004).

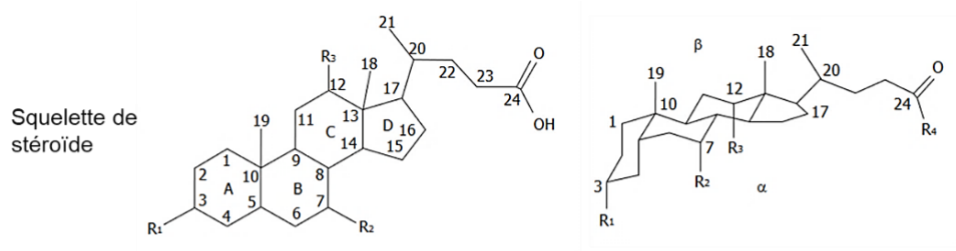
Enfin, les antibiotiques principalement utilisés pour éliminer les bactéries pathogènes, affectent de manière significative le microbiote intestinal de l'hôte. L'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal sera détaillé dans la partie dysbiose. Outre les antibiotiques, beaucoup d'autres médicaments comme par exemple les anti-diabétiques, les inhibiteurs de pompes à protons, les anti-inflammatoires non stéroïdiens contribuent également à la modification de la composition du microbiote (Maier *et al.*, 2018).

2. Le métabolisme des acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules amphipatiques car elles possèdent une partie hydrophobe et une partie hydrophile dotées de puissantes propriétés détergentes. Les acides biliaires sont des agents physiologiques important pour l'absorption des nutriments intestinaux, la sécrétion biliaire des lipides, l'élimination des métabolites toxiques et des xénobiotiques (Chiang, 2013).

2.1. Structure et classification des acides biliaires

Les acides biliaires sont des dérivés de la principale voie de catabolisme du cholestérol chez l'Homme et ont une structure stéroïdienne à 24 atomes de carbone (C₂₄) (Figure 36). Ils sont constitués d'un noyau stéroïde rigide hydrophobe auquel sont attachés un groupe hydroxyle hydrophile et une chaîne latérale acide aliphatique flexible (Kuhajda *et al.*, 2006).



Nom	R1	R2	R3	R4
Acide cholique (CA)	OH	OH	OH	OH
Acide chénodésoxycholique (CDCA)	OH (α)	OH (α)	H	OH
Acide désoxycholique (DCA)	OH	OH	OH	OH
Acide ursodésoxycholique (UDCA)	OH (α)	OH (β)	H	OH
Acide lithocholique (LCA)	OH	H	H	OH
Acide glycocholique (GCA)	OH	OH	OH	NHCH ₂ COO ⁻
Acide taurocholique (TCA)	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻

Figure 36 : Structure des acides biliaires les plus prévalents chez l'Homme.

Adaptée de (Monte *et al.*, 2009).

Il existe deux grandes classes d'acides biliaires : les acides biliaires primaires représentés par l'acide cholique (CA) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA) et les acides biliaires secondaires représentés par l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA) issus de la déconjugaison des acides biliaires primaires. Dans le foie, le CA et CDCA sont conjugués soit à la glycine (75%) pour former l'acide glycocholique (GCA) et l'acide glyochénodésoxycholique (GCDCA) ou soit à la taurine (25%) pour former l'acide taurocholique (TCA) et l'acide taurochénodésoxycholique (TCDCA). La conjugaison permet d'augmenter leur solubilité et permettre leur sécrétion dans la bile.

2.2. Synthèse des acides biliaires

Les acides biliaires sont sécrétés par les hépatocytes dans le canal biliaire et stockés dans la vésicule biliaire en attente d'une sécrétion dans le duodénum lors d'un repas. 70 à 80% du cholestérol du foie sont transformés en acides biliaires par le corps humain. Les acides biliaires sont synthétisés en plusieurs étapes par deux voies principales faisant intervenir environ 17 enzymes différentes. On distingue donc la voie classique (voie neutre) représentant environ 90% de la production totale des acides biliaires primaires et la voie alternative (voie acide) représentant environ 9% de la production totale des acides biliaires primaires (Chiang, 1998).

La voie classique commence par la transformation du cholestérol en 7α -hydroxycholestérol par l'enzyme limitante de la synthèse des acides biliaires qui est présente dans le réticulum endoplasmique et nommée « *cholesterol 7 α -hydroxylase* » (CYP7A1), un cytochrome P450 microsomial. Le 7α -hydroxycholestérol est ensuite converti en CA par l'enzyme « *sterol 12 α -hydroxylase* » (CYP8B1). En absence de CYP8B1, le produit obtenu sera le CDCA. Par conséquent, la proportion de CYP8B1 dans le foie détermine la proportion de CA et CDCA produit. D'un autre côté, l'enzyme « *cholesterol 27 α -hydroxylase* » (CYP27A1) qui est un cytochrome P450 mitochondrial convertit le 7α -hydroxycholestérol en CDCA (Chiang, 1998, 2013).

La voie alternative est quant à elle initiée par l'enzyme CYP27A1. Elle amène principalement à la production de l'acide biliaire CDCA mais aussi du CA- (Chiang, 1998).

Ainsi, la synthèse des acides biliaires par les deux voies produit majoritairement les deux acides biliaires primaires CA et CDCA décrits chez l'Homme.

2.3. Circulation entéro-hépatique des acides biliaires

200 à 600 mg d'acides biliaires sont synthétisés par jour par un individu de poids corporel de 80-90 kg (Chiang, 2013). Les acides biliaires conjugués sont sécrétés et stockés dans la vésicule biliaire via les canalicules où ils sont stockés jusqu'à la consommation de nourriture. Après un repas, la cholécystokinine (CCK), hormone intestinale sécrétée par les cellules de la muqueuse intestinale présentes dans la région proximale de l'intestin (duodénum et jéjunum proximal), stimule la contraction de la vésicule biliaire pour vider les acides biliaires dans le tractus intestinal (Grider, 1994). Dans l'intestin grêle, 95 % des acides biliaires primaires sont réabsorbés dans l'iléon terminal par transport passif ou actif puis transportés vers le foie pour y être reconjugués si nécessaire, puis retransformés dans la vésicule biliaire et ainsi le cycle recommence, correspondant à la circulation entéro-hépatique (Hofmann, 2009).

Les 5 % restants sont éliminés dans les selles et participent à l'hydratation du bol fécal. Le pool des acides biliaires sécrétés dans les selles est reconstitué par la synthèse *de novo* dans le foie (Figure 37). La circulation entéro-hépatique des acides biliaires a lieu en moyenne 4 à 12 fois

par jour afin de maintenir un pool constant d'environ 3 g d'acides biliaires. Ce pool serait composé d'environ 40% de CA, 40% de CDCA, 20% de DCA et de traces de LCA (Chiang, 2013).

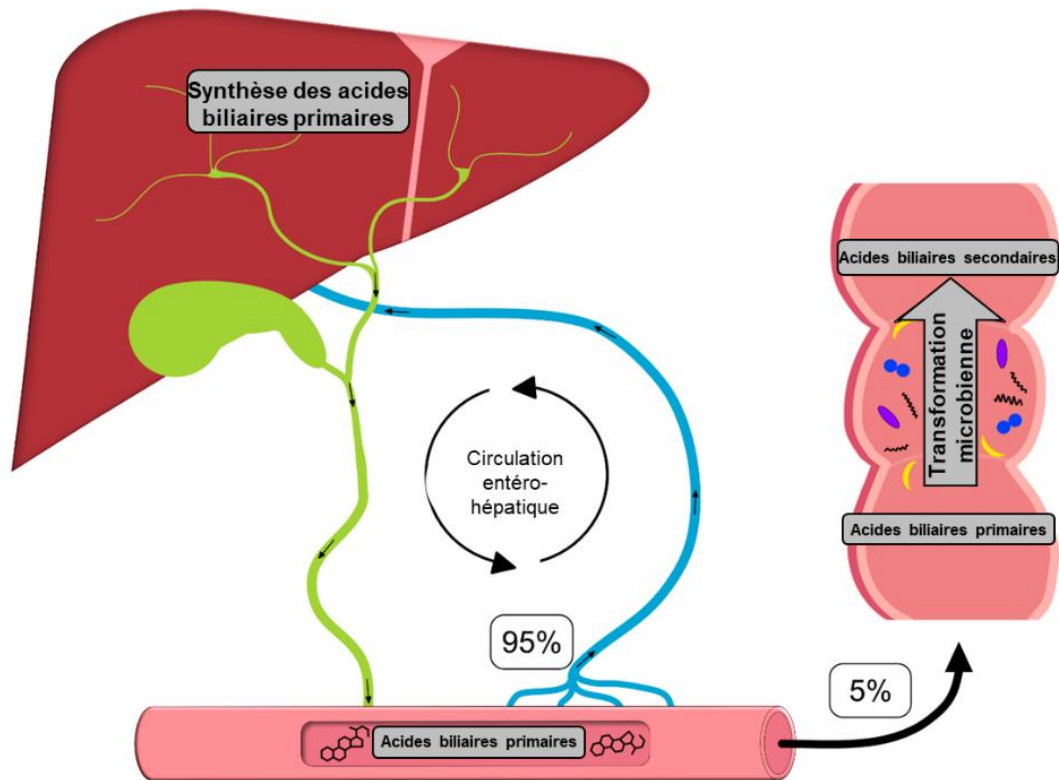


Figure 37 : Circulation entéro-hépatique des acides biliaires.

Les acides biliaires primaires sont synthétisés dans le foie et sécrétés dans le duodénum avec la bile ; 95 % sont réabsorbés dans l'iléon terminal et transportés à nouveau vers le foie pour être recyclés. 5 % restants pénètrent dans le côlon, où ils sont transformés en acides biliaires secondaires par le microbiote intestinal.

Adaptée de (Grüner and Mattner, 2021).

2.4. Biotransformation des acides biliaires par le microbiote intestinal

Cinq pourcents des acides biliaires primaires issus des deux voies de synthèse sont transformés en acides biliaires secondaires par l'action des enzymes produites par certaines bactéries du microbiote intestinal. Au niveau du microbiote intestinal, les acides biliaires conjugués sont tout d'abord dé-conjugués, c'est-à-dire libérés de la taurine ou de la glycine. Cette dé-conjugaison est catalysée par les enzymes bactériennes nommées « *Bile Salt Hydrolases* » (BSH). Ces BSH sont synthétisées par les bactéries intestinales Gram positif dont les *Lactobacillus* (Elkins *et al.*, 2001), les *Enterococcus* (Franz *et al.*, 2001), les *Bifidobacterium* (Kim *et al.*, 2004; Grill *et al.*, 1995), et les *Clostridium* (Coleman and Hudson, 1995) de même que certaines bactéries Gram négatif comme *Bacteroides spp* (Kawamoto *et al.*, 1989). Une fois les acides biliaires libérés de la taurine et de la glycine, ils subissent d'autres réactions pour être

transformés en acides biliaires secondaires par des enzymes microbiennes dont les 7 α /7 β -dehydroxylases. Les 7 α /7 β -dehydroxylases sont codées par l'opéron « *bile acid-inducible* » (*bai*) présent chez quelques espèces bactériennes appartenant aux Clostridia dont *Clostridium scindens*, *Clostridium hylemonae*, *Clostridium hiranonis*, *Clostridium sordellii* et *Clostridium leptum* (Wells and Hylemon, 2000; Ridlon *et al.*, 2006, 2010, 2016).

L'enzyme bactérienne 7 α -dehydroxylase transforme les formes dé-conjuguées de CA et CDCA respectivement en deux acides biliaires secondaires : l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA). D'autre part, la 7 β -dehydroxylase dé-conjugué l'acide ursodésoxycholique (UDCA) en LCA (Ridlon *et al.*, 2016). Ces acides biliaires secondaires DCA et LCA sont les plus abondants dans les selles de l'Homme (Figure 38).

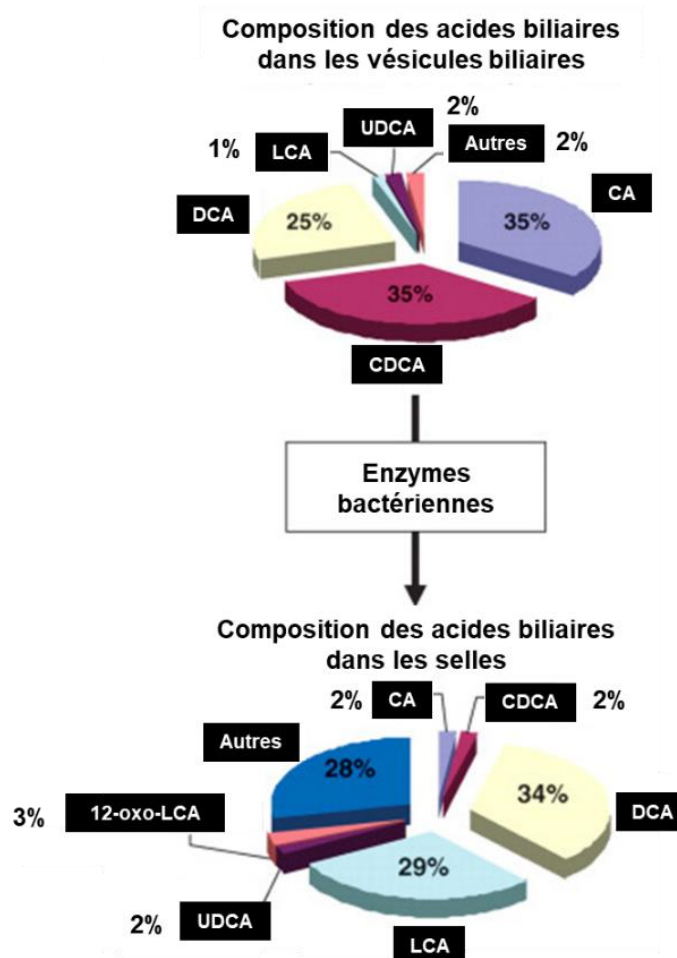


Figure 38 : Proportion des acides biliaires dans la vésicule biliaire et dans les selles chez l'Homme.

CA : acide cholique ; CDCA : acide chénodésoxycholique ; DCA : acide désoxycholique ; LCA : acide lithocholique ; UDCA : acide ursodésoxycholique.

Adaptée de (Ridlon *et al.*, 2006).

De même que pour les acides biliaires primaires, une fois synthétisés les acides biliaires secondaires sont conjugués à la taurine ou la glycine et forment l'acide taurodésoxycholique (TDCA), l'acide glycodésoxycholique (GDCA), l'acide tauroolithocholique (TLCA) et l'acide glycolithocholique (GLCA). Par ailleurs, une partie des acides biliaires secondaires sont réabsorbés vers le foie et après l'absorption par les hépatocytes, ils sont à nouveau conjugués à la taurine ou la glycine et forment le CA et le CDCA, l'autre partie est excrétée dans les selles (Li and Dawson, 2019).

En absence de la transformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires par les bactéries du microbiote intestinal, la diversité du pool des acides biliaires est modifiée. Ceci peut conduire à pathologies métaboliques ou favoriser l'implantation de bactéries pathogènes exogènes ou opportunistes endogènes.

2.5. Impact des acides biliaires sur les bactéries du microbiote digestif

Des études *in vitro* ont montré que les acides biliaires jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée et sont de puissantes molécules antimicrobiennes. Sung *et al.* ont montré *in vitro* que le TCDCA et le DCA inhibent fortement la croissance de bactéries telles qu'*Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* par rapport au TCA, CDCA et TUDCA. Néanmoins, l'ajout de la lécithine qui mime les conditions *in vivo* réduit fortement leur activité antimicrobienne (Sung *et al.*, 1993). Par ailleurs, Sannasiddappa *et al.* ont montré que le CA et DCA ont une action bactéricide sur *Staphylococcus aureus* à la concentration minimale inhibitrice. A une concentration subinhibitrice, le CA, le DCA de même que le GCA et le TCA sont capables d'inhiber la croissance de *S. aureus* (Sannasiddappa *et al.*, 2017).

D'autre part, de faibles quantités d'acides biliaires dans l'intestin sont associées à la croissance des bactéries et à leur translocation dans l'intestin grêle. Il a été montré que l'administration d'acides biliaires conjugués à des rats cirrhotiques ascitiques a augmenté la sécrétion d'acides biliaires ce qui inhibe la croissance bactérienne et réduit la translocation bactérienne réduisant ainsi l'endotoxémie chez le rat (Lorenzo-Zúñiga *et al.*, 2003).

Le microbiote intestinal participe ainsi à la régulation de la biotransformation des acides biliaires favorisant le maintien de l'homéostasie intestinale. Une perturbation dans la structure et dans les fonctions du microbiote peut conduire à une avalanche de réactions pouvant être délétères pour l'hôte notamment l'émergence ou la colonisation par certaines espèces pathogènes comme *C. difficile*.

3. La réponse immune

Le système immunitaire peut être divisé en immunité innée composée de cellules épithéliales et les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques et macrophages) et en immunité adaptative composée de lymphocytes T (dérivés du thymus) et B (dérivés de la moelle osseuse) (Figure 39). Bien que les mécanismes et les propriétés par lesquels l'immunité innée et adaptative soient induits soient distincts, ils s'associent pour améliorer la défense de l'hôte et éliminer rapidement le pathogène (Netea *et al.*, 2019).

3.1. La mise en place de la réponse immune innée

Lors d'une infection, l'immunité innée est la première à se mettre en place conduisant à une réaction inflammatoire. Elle est déclenchée lorsque les cellules immunitaires de l'hôte détectent les motifs moléculaires PAMPs « *Pathogen Associated Molecular Pattern* ». Les PAMPs sont des molécules activatrices produites par le microbiote et conservées entre les pathogènes. En pratique ces molécules correspondent aux flagellines, les lipopolysaccharides (LPS), le peptidoglycane, le manane des champignons et les acides nucléiques bactériens et viraux (Akira *et al.*, 2006). Les PAMPs sont reconnus par l'intermédiaire des PRR « *Pattern-Recognition Receptors* » codés par la lignée germinale dont les TLR « *Toll-like receptor* », les récepteurs de type RIG-I (RLR « *RIG like receptor* »), les récepteurs de type NOD « *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* » (NLR « *NOD-like receptor* »). Les RLR et les NLR sont cytosoliques (Kumar *et al.*, 2011). Ces PRR sont principalement exprimés par les cellules myéloïdes telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, (Kumar *et al.*, 2011). Les PRR sont capables de discriminer entre le soi et le non soi, c'est-à-dire être capable de distinguer entre les antigènes des pathogènes et ceux provenant des aliments ou des microorganismes commensaux (Hevia *et al.*, 2015). L'interaction entre les PRR et les PAMPs entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation conduisant à la production des AMPs par les cellules de Paneth et des glycoprotéines des mucines par les cellules caliciformes. De plus, cette interaction conduit également à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires à travers l'activation des voies de signalisation NF- κ B « *Nuclear factor- κ B* » et AP-1 « *Activator protein 1* », le recrutement de polynucléaires neutrophiles et de macrophages et la sécrétion des IgA sécrétoires par les plasmocytes dans le cadre d'une stratégie globale de protection de l'hôte contre les pathogènes (Figure 39).

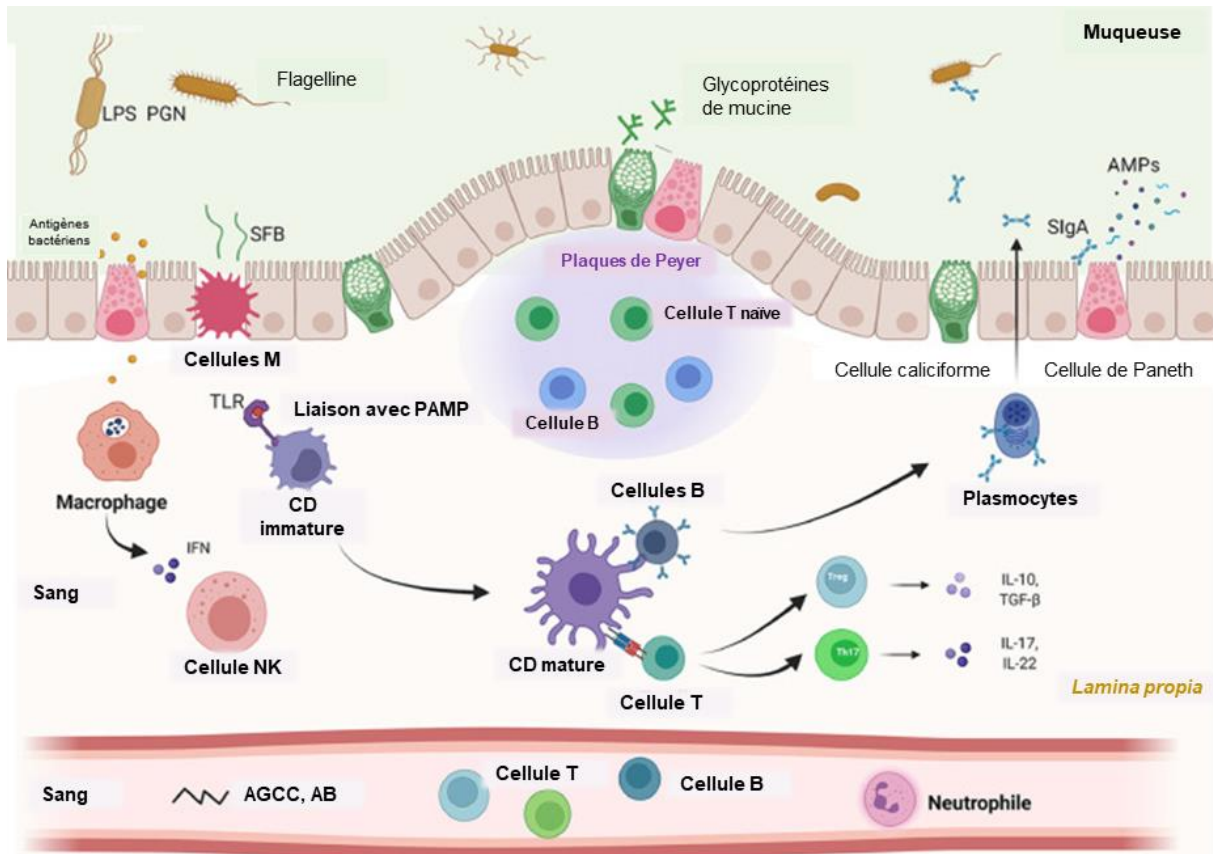


Figure 39 : Immunité de l'hôte stimulée par le microbiote.

PGN : peptidoglycane ; LPS : lipopolysaccharide ; AMPs : peptides antimicrobiens ; CD : cellule dendritique ; SIgA : *Secretory IgA* (IgA sécrétoire) ; SFB : bactérie filamenteuse segmentée ; TLR : *Toll like receptor* ; AGCC : acide gras à chaîne courte ; AB : acide biliaire ; PAMPs : *Pathogen Associated Molecular Pattern*.

Adaptée de (Li *et al.*, 2022).

3.2. La mise en place de la réponse immunitaire adaptative

Le système immunitaire adaptatif est constitué de deux groupes de cellules à savoir les lymphocytes T et les lymphocytes B. Sa mise en place commence lorsque les antigènes sont capturés soit par les cellules épithéliales différenciées appelées cellules M (*Microfold cells*) dans les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés ou soit par les cellules dendritiques. La présentation des antigènes aux lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires conduit à la prolifération des lymphocytes générant des clones spécifiques de l'antigène et à la différenciation vers diverses voies à savoir des cellules effectrices ou des cellules mémoire (Murphy *et al.*, 2022).

Les lymphocytes T peuvent être séparés en deux types : les cellules auxiliaires CD4+ (cellules *T helper*) ou des cellules cytotoxiques CD8+. Pour éliminer le pathogène, l'activation des cellules T CD8+ se fait via les cellules dendritiques exprimant à leur surface le complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH) en particulier CMH-I lié aux peptides de l'antigène. Cette interaction conduit à la mort des pathogènes. Dans le cas des cellules T CD4+, l'activation se fait par la présentation des antigènes par les cellules dendritiques exprimant à leur surface les molécules du CMH-II lié aux peptides de l'antigène (Murphy *et al.*, 2022). Cette interaction peut aboutir à une réponse pro-inflammatoire (effectrice) ou à une réponse anti-inflammatoire (régulatrice) en fonction de l'environnement, notamment la présence ou non de cytokines. En fonction de cytokines produites, on distingue trois types de cellules effectrices (Bonilla and Oettgen, 2010) :

- les cellules Th1 : en présence de l'interleukine 12 (IL-12) et de l'interféron γ (INF- γ), les Th1 favorisent la production d'IL-2 et INF- γ . Elles sont impliquées dans la réponse aux infections bactériennes et virales en activant les macrophages, les cellules NK « *Natural Killer* » et les cellules T cytotoxique (T CD8+) ;
- les cellules Th2 : en présence de l'IL-4, les Th2 favorisent la synthèse d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. Elles sont impliquées dans la prolifération des lymphocytes B de même que la production des anticorps. Cette réponse est majoritairement humorale, en effet, la production d'anticorps dépend des cellules B et des signaux fournis par les cellules T (Murphy *et al.*, 2022) ;
- les cellules Th17 : en présence d'IL-6, IL-23 et « *Transforming Growth Factor β* » (TGF- β), les cellules Th17 vont favoriser la synthèse d'IL-17 et IL-22. Les Th17 sont impliquées dans la réponse aux infections bactériennes et dans plusieurs maladies auto-immunes.

En ce qui concerne les lymphocytes T régulateurs (Treg) présents au niveau de la *lamina propria*, leur fonctionnement dépend du facteur TGF- β , d'IL-10 et du facteur de transcription Foxp3 qui régule l'expression de certains gènes (comme IL-2, IL-4) conduisant au phénotype Treg. Ils favorisent la production de TGF- β et d'IL-10 et sont impliqués dans la tolérance immunitaire envers l'antigène du soi. Ces cellules ont un effet immunosuppresseur sur les cellules immunitaires (Murphy *et al.*, 2022).

Outre ces fonctions métaboliques et de barrière, le microbiote intestinal contribue également à la modulation et au développement du système immunitaire de l'hôte. Par exemple, il a été montré *in vitro* que les *Lactobacillus spp.* peuvent réguler la différenciation des cellules dendritiques, modulant ainsi la réponse des cellules Th1 et Th2 (Christensen *et al.*, 2002). De plus, chez les souris « *Germ-free* », il a été montré que la présence du phylum Bacteroidetes était important pour la différenciation des cellules Th17 au niveau de la *lamina propria* (Ivanov *et al.*, 2008). En outre, des études ont montré que *Bacteroides fragilis* et les métabolites du microbiote comme le butyrate pouvait induire l'activation des cellules Treg via la production

d'IL-10 et TGF- β au niveau colique (Round and Mazmanian, 2010; Furusawa *et al.*, 2013). Ainsi, même en absence d'infection, le microbiote régule la production de ces lymphocytes T afin de maintenir l'homéostasie intestinale.

Dans le cas des lymphocytes B, les cellules B activées se différencient en cellules B mémoire et en plasmocytes producteurs de protéines spécialisées appelées les immunoglobuline (Ig). Ces Ig peuvent servir de récepteurs spécifiques présents sur les cellules B (BCR « *B-cell receptor* ») ou sous forme sécrétée appelée anticorps ayant la même spécificité antigénique (Murphy *et al.*, 2022). Cette sécrétion d'anticorps représente la principale fonction effectrice des cellules B. Ces anticorps ont pour fonction de se lier spécifiquement à certaines protéines des pathogènes ou leurs facteurs de pathogénicité afin de neutraliser ce pathogène. Il existe cinq différentes classes d'immunoglobulines : les immunoglobulines M (IgM, sont les premières à être produites), les immunoglobulines D (IgD), les immunoglobulines G (IgG, retrouvées dans la circulation sanguine et dans les espaces extracellulaires des tissus), les immunoglobulines E (IgE) et les immunoglobulines A (IgA, dans la circulation sanguine et pour la défense de la surface de la muqueuse intestinale) (Murphy *et al.*, 2022).

Les IgA sécrétoires

Les IgA sécrétoires (IgAs) constituent également une ligne de défense par laquelle leur sécrétion peut limiter la prolifération des pathogènes opportunistes (Mathias *et al.*, 2014). Leur sécrétion est médiée par les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT « *gut-associated lymphoid tissues* ») telles que les plaques de Peyers, les follicules lymphoïdes isolés et les ganglions lymphatiques mésentériques au niveau de la *lamina propria* (Rol *et al.*, 2012). Les cellules dendritiques vont interagir avec les cellules régulatrices Treg pour induire la différenciation des cellules B naïves en plasmocytes producteurs des IgAs (Figure 39). Les IgAs sont produites sous forme de dimères. Il existe toutefois des monomères d'IgA sériques mais elles ne possèdent pas de composante sécrétoire donc ne peuvent pas se lier aux cellules myéloïdes (Snoeck *et al.*, 2006). Les IgAs produites vont migrer des organes lymphoïdes vers la *lamina propria* intestinale et être transloquées par transcytose à travers les cellules épithéliales. Une fois dans la couche externe du mucus, les IgAs vont conférer une protection contre les pathogènes tout en maintenant une relation mutuellement bénéfique avec les bactéries commensales, à travers un phénomène appelé « exclusion immunitaire ». Les IgAs peuvent interagir avec les microorganismes et inhiber leur adhésion, la colonisation et l'invasion de la muqueuse intestinale (Mantis *et al.*, 2011). Cette interaction entre les IgAs et les microorganismes va conduire à l'agglutination de ces derniers qui se retrouveront piégés par les IgAs puis éliminés dans les selles en amas de bactéries suite à des mouvements péristaltiques de l'intestin. Elles possèdent une demi-vie très courte (4-7 jours) en comparaison des immunoglobulines G (IgG) qui ont une demi-vie plus longue (environ 21 jours) (van Tetering *et al.*, 2020).

Ainsi, le microbiote intestinal est en constante interaction avec l'hôte à travers le mucus, les cellules épithéliales, les cellules mononuclées qui sont des sentinelles du système immunitaire et médient les informations importantes aux cellules immunitaires localisées au niveau de la *lamina propria*. Son altération peut conduire à une cascade de réaction pouvant entraîner des pathologies chez l'hôte.

B. La dysbiose

Le microbiote intestinal joue un rôle important dans le métabolisme des molécules, le développement et la maturation du système immunitaire. De par sa fonction de résistance à la colonisation, le microbiote contribue à la protection de l'hôte contre la colonisation par des organismes potentiellement pathogènes. Cependant, des facteurs environnementaux peuvent altérer la composition et les fonctions du microbiote sur du court et du long terme perturbant ainsi l'équilibre symbiotique entre le microbiote intestinal et son hôte. Cette altération du microbiote est appelée dysbiose. Parmi les facteurs perturbant l'homéostasie du microbiote notamment les xénobiotiques et l'utilisation des antibiotiques. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la dysbiose induite par les antibiotiques car elle représente le facteur majeur de susceptibilité de l'implantation de *C. difficile*.

La dysbiose est caractérisée par la perte de la résistance à la colonisation par des pathogènes endogènes ou exogènes et une reconstitution progressive de l'écosystème de base appelée résilience du microbiote, qui peut être partielle après la dysbiose (Chow and Mazmanian, 2010).

La diminution de la diversité du microbiote notamment la diversité alpha entraîne une perte importante dans les principales fonctions du microbiote pouvant conduire à des pathologies chroniques inflammatoires comme la maladie de Crohn et les rectocolites ou d'autres pathologies comme des cancers, le diabète et l'obésité. (Hou *et al.*, 2022). Dans le cas des infections à *C. difficile*, l'altération du microbiote intestinal et de ses fonctions dont la biotransformation des acides biliaires favorisent d'une part l'implantation, le développement et d'autre part l'évolution vers l'infection (Buffie *et al.*, 2015).

1. Impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal

Des études chez l'Homme et chez les animaux ont montré que l'exposition aux antibiotiques induit une altération dans la structure du microbiote, dans sa composition en espèces mais aussi dans la capacité métabolique rendant le microbiote susceptible à la colonisation et à la prolifération de certaines bactéries pathogènes (Figure 40).

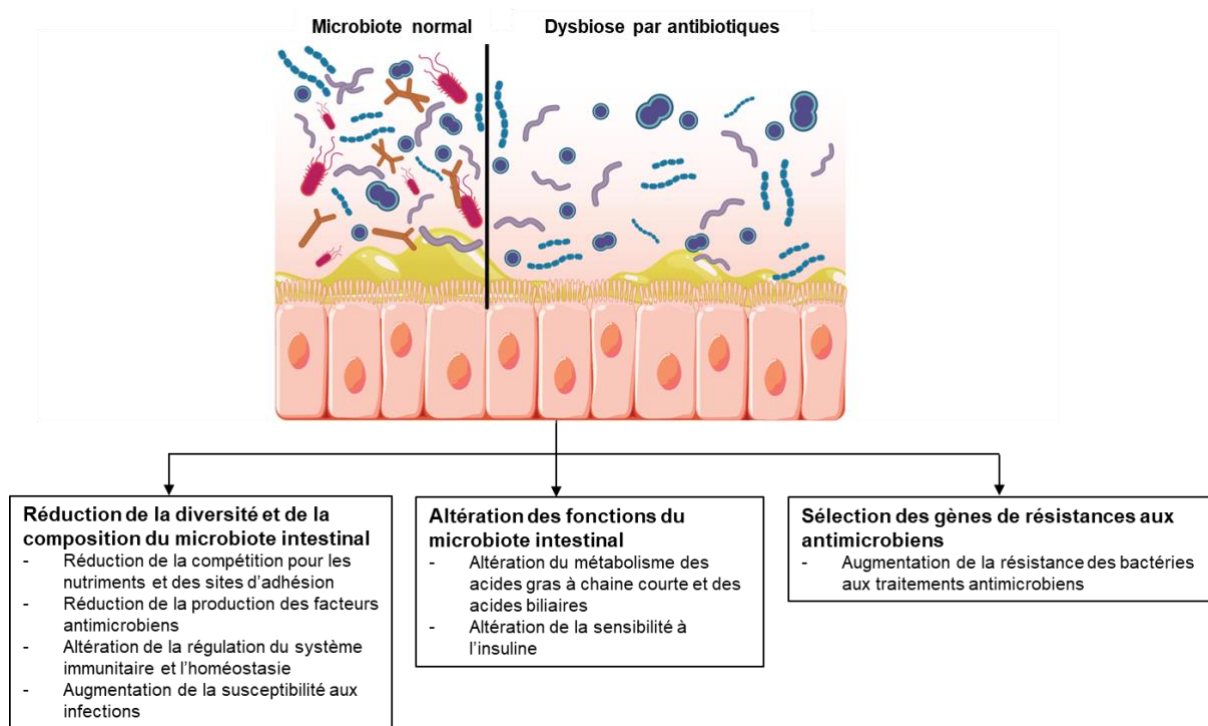


Figure 40 : Impact de la dysbiose induite par les antibiotiques sur le microbiote intestinal et ses fonctions.

Adaptée de (Seekatz *et al.*, 2022).

Il a été montré qu'un traitement par la ciprofloxacine réduit significativement la richesse et la diversité du microbiote intestinal chez des adultes sains après seulement 3 à 4 jours de traitement. Une résilience incomplète du microbiote a été observée chez un patient 4 semaines puis 6 mois après l'arrêt du traitement. Cependant, la nouvelle population installée n'inclue pas forcément tous les membres observés avant le traitement par la ciprofloxacine (Dethlefsen and Relman, 2011).

Chez la souris, un traitement par un cocktail d'antibiotiques contenant de l'amoxicilline, du métronidazole et du bismuth mélangé à l'aliment a conduit à l'augmentation des Protéobactéries spécialement la famille des *Enterobacteriaceae* et la diminution de Bacteroidetes et des *Firmicutes* par rapport aux témoins chez qui les *Firmicutes* et les Bacteroidetes sont dominants. Tout comme chez l'Homme, la résilience incomplète du microbiote observée chez les souris traitées était hétérogène et variait de deux semaines à 6 mois (Antonopoulos *et al.*, 2009).

Le traitement de 12 individus sains par un cocktail de méropénem, de gentamicine et de vancomycine a induit une baisse de la diversité après seulement quatre jours de traitement avec une diminution des *Bifidobacterium* impliqués dans la production des butyrates au profit des *Enterobacteriaceae* et de certains pathobiontes. Par ailleurs, une résilience de la plupart des bactéries a été observée au 180^{ème} jour (Palleja *et al.*, 2018). De plus, les patients traités par

des antibiotiques après une chirurgie ont montré une diminution des bactéries associées à des infections notamment *C. perfringens*, *Ruminococcus gnavus* et *Klebsiella pneumoniae* mais aussi les espèces bénéfiques, telles que *Faecalibacterium prausnitzii*. Néanmoins, le microbiote de ces patients était dominé par les anaérobies facultatives tels que les *Enterococcus* et les *Streptococcus* (Dubinsky *et al.*, 2020).

Une autre étude portant sur l'impact des antibiotiques s'est intéressée à l'action du cefprozil, une céphalosporine deuxième génération présentant un spectre d'action large sur les bactéries Gram positif et négatif. L'étude de la composition du microbiote des individus sains a montré que leur microbiote avant le traitement par le cefprozil était variable mais dominé par les *Bacteroidaceae*. Les espèces dominantes trouvées dans les selles avant le traitement par les antibiotiques appartenait aux genres *Bacteroides*, *Akkermansia*, *Alistipes*, *Bacteroides*, *Dialister*, *Parabacteroides* et *Prevotella*. A la suite du traitement, il a été observé une diminution significative des *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Pasteurellaceae*, et des *Veillonellaceae* et une augmentation des *Enterobacteriaceae* comme ce qui a pu être observé dans les études précédentes (Raymond *et al.*, 2016).

Ces données montrent que le traitement par les antibiotiques, notamment ceux à large spectre comme les fluoroquinolones, les céphalosporines et la clindamycine, réduisent la diversité microbienne. Bien que la diversité soit réduite, le nombre de bactéries détectées dans les selles n'est pas forcément réduit suggérant qu'à la suite d'une antibiothérapie, les bactéries sensibles à l'antibiotique utilisé seront éliminées mais les bactéries résistantes prendront leur place. De plus, l'altération du microbiote par les antibiotiques semble être reproductible et durable. Quel que soit l'antibiotique utilisé, il est observé une diminution des Firmicutes et des Bacteroidetes dont les *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* et *Ruminococcus spp.* au profit des Protéobactéries suggérant que les Protéobactéries spécialement les *Enterobacteriaceae* sont des marqueurs de dysbiose induite par les antibiotiques. Par ailleurs, certaines des espèces ayant disparus interviennent dans les fonctions importantes du microbiote notamment dans le métabolisme des glucides et la biotransformation des acides biliaires.

2. Impact des antibiotiques sur le métabolome intestinal

Une des conséquences de la dysbiose du microbiote intestinal est la perte de certaines fonctions métaboliques. Des études du métabolome et du microbiote ont montré que le traitement par la streptomycine altère à 87% le métabolome intestinal dont le métabolisme des acides aminés, des acides gras, des stéroïdes et des acides biliaires (L. C. M. Antunes *et al.*, 2011).

Par ailleurs, la gentamicine et la ceftriaxone réduisent le métabolisme des oligosaccharides, des acides aminés et des acides biliaires (Zhao *et al.*, 2013). Cho *et al.* ont montré chez des souris

que le traitement par la vancomycine ou par la pénicilline à faible dose entraîne une augmentation de l'adiposité et des hormones. Cette augmentation serait liée à la modification du métabolome notamment le métabolisme des glucides en acides gras à chaîne courte qui sont retrouvés en quantités importantes dans le colon. De plus, des altérations dans la régulation du métabolisme des lipides et du cholestérol ont été observées (Cho *et al.*, 2012).

Ces données montrent que l'altération du microbiote par les antibiotiques conduit à une augmentation des glucides, des acides aminés, des acides biliaires primaires (CA, TCA, GCA) dans le microbiote. Ceci est corrélé à la perte de la diversité microbienne et probablement la disparition des espèces responsables de la métabolisation de ces molécules rendant ainsi l'environnement propice à la colonisation par des bactéries pathogènes comme *C. difficile*, *Enterococcus spp.* ou *Salmonella typhimurium*.

3. Impact des antibiotiques sur la réponse immune

Outre leur impact direct sur le pathogène, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les antibiotiques ont des effets directs sur la réponse immune innée. Les macrolides, par exemple, peuvent stimuler le chimiotactisme phagocytaire et favoriser la différenciation des monocytes-macrophages. En revanche, les tétracyclines inhibent ce chimiotactisme phagocytaire et favorisent la formation des granulomes (Pomorska-Mól and Pejsak, 2012).

Des études ont montré que les fluoroquinolones peuvent moduler la réponse immune (Assar *et al.*, 2021). Par exemple, Williams *et al.*, ont montré *in vitro* que la moxifloxacine et la ciprofloxacine peuvent avoir un effet important sur l'expression des cytokines des cellules Th1 et Th2 sans toutefois modifier le ratio de la réponse Th1/Th2. En revanche, la clarithromycine réduit l'expression de l'IL-4, entraînant à la diminution du ratio Th1/Th2 (Williams *et al.*, 2005).

Comme décrit dans la première partie de ce chapitre 3, en fonction des cytokines produites, la présentation des cellules dendritiques aux cellules T CD4+ conduit à des réponses différentes. Par conséquent, des altérations dans la production des cytokines peuvent non seulement modifier la réponse cellulaire mais aussi la réponse humorale contre les pathogènes. Des études chez la souris ont également montré que le traitement par les antibiotiques réduit l'expansion des cellules T et limite le développement des cellules T mémoire ce qui conduit à une réponse inadéquate contre l'infection (Benoun *et al.*, 2016). Les antibiotiques semblent donc avoir des effets immunosuppresseurs sur la réponse immune.

4. Conséquences de l'altération du microbiote intestinal sur les infections à *Clostridioides difficile*

C. difficile est une bactérie anaérobie stricte qui forme des spores suite au manque de disponibilité de nutriments essentiels. L'utilisation des antibiotiques à large spectre comme la

clindamycine, les fluoroquinolones, les céphalosporines altère la composition du microbiote résultant en la perte de la résistance contre la colonisation par *C. difficile*.

4.1. Le microbiote dans les infections à *Clostridioides difficile*

Des études ont comparé la composition du microbiote d'individus de tout âge présentant une ICD à celle d'individus avec un portage asymptomatique ou à celle d'individus non colonisés par *C. difficile* afin de déterminer les espèces présentes lors de l'ICD et de leurs rôles dans l'évolution de l'infection. Les enfants peuvent être colonisés par *C. difficile* y compris par des souches toxigènes (malgré des toxines libres détectables dans les selles) mais ne développent pas d'infection. Une analyse du microbiote de ces enfants colonisés a montré que la colonisation par *C. difficile* est associée à la présence de *Ruminococcus gnavus* et *Klebsiella pneumoniae* alors que la résistance à la colonisation est associée à la présence de *Bifidobacterium longum* (Rousseau *et al.*, 2011b).

Cependant, chez les personnes de plus de 65 ans le niveau de *Bifidobacterium* est diminué pouvant suggérer un rôle important de ce genre dans le développement d'une ICD (Woodmansey *et al.*, 2004).

Par ailleurs, l'analyse du microbiote des porteurs asymptomatiques a montré une faible prévalence des Protéobactéries et une prédominance des Firmicutes et des Bacteroidetes par rapport à individus présentant une ICD. Toutefois, en comparaison d'individus sains, la diversité et la richesse microbienne est réduite chez les patients ICD tout comme chez les porteurs asymptomatiques. De plus, certaines bactéries productrices de butyrate (*Bifidobacterium spp.*, *Ruminococcaceae*, *Faecalisbacterium*, *Akkermansia*, *Eubacteria*), étaient significativement appauvries chez les patients atteints d'ICD et les porteurs asymptomatiques (Zhang *et al.*, 2015).

Khana *et al.* ont proposé que le microbiome intestinal pouvait prédire la réponse aux antibiotiques et le risque de récurrence chez des patients ayant déclaré un premier épisode d'ICD. Ils ont observé que les patients répondants au traitement présentaient une augmentation de l'abondance relative des *Ruminococcaceae*, *Rikenellaceae*, *Bacteroides* et *Faecalibacterium* en comparaison des patients ne répondant pas au traitement. Chez ces patients non répondants, il a été observé une augmentation des *Lachnospiraceae*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Actinomyces* (Khanna *et al.*, 2016). De plus, les patients présentant des récurrences avaient l'abondance relative en *Veillonella*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Parabacteroides* et *Lachnospiraceae* significativement plus élevée par rapport aux patients ne présentant pas de récurrence (Khanna *et al.*, 2016). Le risque de survenue de la récurrence de l'ICD serait donc associé à la persistance de la perte de la résistance à la colonisation par *C.*

difficile dû à la dysbiose additionnelle induite par les antibiotiques de traitement de l'ICD ce qui retarde la résilience du microbiote.

Récemment, dans une étude prospective, Berkell *et al.* ont identifié des marqueurs pouvant prédire le développement d'une ICD chez 945 patients à risques hospitalisés âgés de plus de 54 ans sur des échantillons prélevés avant et après traitement par les antibiotiques et à l'apparition de la diarrhée (Berkell *et al.*, 2021). Comparativement aux patients non ICD, ils ont montré que les patients ICD ont un microbiote enrichi en *Enterococcus* et un microbiote appauvri en *Ruminococcus*, *Blautia*, *Prevotella* et *Bifidobacterium*. De plus, ils ont montré le traitement par les β -lactamines induisent une dysbiose additionnelle du microbiote caractérisée par l'augmentation de l'abondance relative des *Enterococcus* (Berkell *et al.*, 2021).

Ainsi, l'ensemble de ces études montrent que l'abondance des Firmicutes, notamment les *Ruminococcaceae*, les *Lachnospiraceae*, et l'abondance des Bacteroidetes, dont les *Bacteroides* et les *Faecalibacterium*, et l'abondance des Actinobacteria, dont les *Bifidobacterium* sont associées à la résistance à la colonisation. Cependant, l'abondance des Protéobactéries, dont les *Enterobacteriaceae* et quelques *Lachnospiraceae*, est quant à elle associée à la colonisation par *C. difficile*.

4.2. Les acides biliaires dans les infections à *Clostridioides difficile*

Dans les infections à *C. difficile*, l'altération du microbiote intestinal conduit à la modification du profil métabolique spécialement celui des acides biliaires. Des études ont montré le rôle des acides biliaires et des enzymes impliquées dans leur biotransformation dans les infections à *C. difficile*. Allegretti *et al.* ont comparé l'abondance du gène *bsh*, intervenant dans la déconjugaison des acides biliaires primaires, lors de la biotransformation dans des selles de patients présentant un premier épisode déclaré d'ICD, ceux avec une récurrence et les individus non colonisés par *C. difficile* (Allegretti *et al.*, 2016). Les auteurs ont utilisé un outil de métagénomique inférentielle nommé PICRUST afin d'analyser l'interaction entre les abondances prédites du gène *bsh* et la quantité des acides biliaires dans les selles. Ils ont montré que l'abondance du gène *bsh* était significativement plus faible chez les patients présentant une récurrence en comparaison des patients avec un premier épisode d'ICD et les individus non colonisés par *C. difficile*. Par ailleurs, la quantité des acides biliaires primaires était significativement plus élevée chez les patients présentant une récurrence en comparaison des patients avec un premier épisode d'ICD et les individus non colonisés par *C. difficile* (Allegretti *et al.*, 2016). Les acides biliaires secondaires dont le LCA et le DCA étaient significativement plus faibles chez les patients présentant des récurrences. Les auteurs en ont conclu que les acides biliaires secondaires dont le DCA sont des marqueurs de prédiction de récurrence d'ICD (Allegretti *et al.*, 2016).

De plus, une étude a montré que le cluster de gène *baiCD*, présent sur l'opéron *bai* portant les gènes responsables de la biotransformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires, était significativement plus exprimé dans les selles de patients non colonisés par *C. difficile* au moment des essais par rapport aux patients ayant déclaré une ICD. Ces résultats suggèrent que l'abondance des espèces portant le cluster de gène *baiCD* comme *C. scindens* serait corrélée à la résistance à la colonisation par *C. difficile* (Solbach *et al.*, 2018).

Ainsi, l'altération de la diversité du microbiote intestinal, notamment la perte des espèces impliqués dans la dé-conjugaison et l'hydroxylation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires conduit à une accumulation des acides biliaires primaires. Cela crée un environnement favorable à la germination des spores de *C. difficile* et donc au développement de l'infection.

4.3. La réponse immune dans les infections à *Clostridioides difficile*

Outre sa relation avec le microbiote, les interactions de *C. difficile* avec l'épithélium de l'hôte, les réponses immunes innée et adaptative jouent un rôle important dans l'évolution de l'infection (Figure 41).

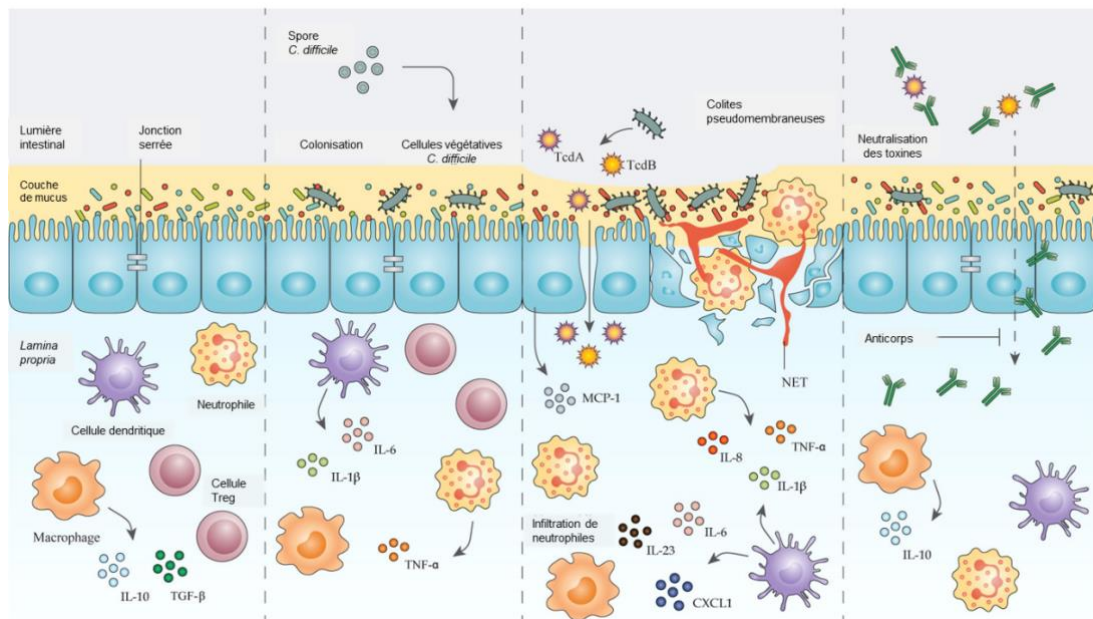


Figure 41 : Réponse immune innée et adaptative induite par les toxines de *C. difficile*.

La perte de la résistance aux pathogènes du microbiote intestinal va favoriser l'implantation et la multiplication de *C. difficile* au niveau du côlon et conduire à la production des toxines TcdA et TcdB. Ces toxines qui vont altérer le cytosquelette d'actine et induire la perte de l'intégrité de l'épithélium, la mort cellulaire conduisant au recrutement de nombreux polynucléaires neutrophiles et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires provoquant une forte réaction inflammatoire au niveau du colon responsable des manifestations cliniques de l'infection (diarrhée simple à sévère, avec des complications comme des colites pseudomembraneuses). Adaptée de (Raesi *et al.*, 2022).

4.3.1. La réponse immune innée dirigée contre *Clostridioides difficile*

L'épithélium intestinal représente la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes avec la couche de mucus qui crée une barrière physique de défense contre les bactéries de la lumière intestinale. La perte de l'intégrité de cet épithélium induite par l'action des toxines TcdA et TcdB de *C. difficile* va conduire à la libération de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Ces cytokines vont stimuler le recrutement des neutrophiles, des éosinophiles, des macrophages, des mastocytes et des cellules dendritiques sur le site de l'infection et à la sécrétion de peptides antimicrobiens pour éliminer *C. difficile*. La rupture des jonctions serrées par les toxines va également permettre aux toxines de même que les protéines de surface dont SlpA et FliC d'arriver au niveau de la *lamina propria* et induire l'activation d'une deuxième phase d'inflammation et par conséquent une production importante de cytokines pro-inflammatoires. Cet afflux excessif de cellules de l'immunité innée va entraîner des lésions tissulaires importantes dont les colites pseudomembraneuses (Figure 41). Cette réponse inflammatoire conduit à l'activation des cellules présentatrices d'antigènes dont les cellules dendritiques et leur coopération avec les lymphocytes pour induire une réponse immune adaptative systémique et mucosale (Nibbering *et al.*, 2021).

Il existe très peu de données sur l'immunité innée induite pendant l'ICD chez l'homme car cette réponse est précoce. Les études sont majoritairement conduites chez les animaux dont la souris et dans les lignées cellulaires. Elles seront détaillées dans le paragraphe dédié – étude de la réponse immune innée dans les ICD.

4.3.2. La réponse immune adaptative dirigée contre *Clostridioides difficile*

Dans cette thèse, nous allons nous intéresser principalement à la réponse humorale induite en réponse à l'infection à *C. difficile*. Dans le cas des ICD, les cellules B naïves vont se différencier en plasmocytes et en cellules B mémoire spécifiques contre les facteurs de virulence de *C. difficile* dont les toxines TcdA et TcdB de même que contre les protéines de surface dont SlpA et FliC. Une réponse immunitaire déficiente peut entraîner la chronicité de l'infection.

a) La réponse immune adaptative dirigée contre les toxines de *C. difficile*

Comme décrit dans le chapitre 1, la toxine A et la toxine B représentent les principaux facteurs de virulence de *C. difficile* et sont hautement immunogènes. Chaque toxine induit la production d'anticorps spécifiques et par conséquent ne provoque pas de réaction croisée entre les deux toxines (Libby and Wilkins, 1982; Leuzzi *et al.*, 2013).

Seulement de rares études de séro-épidémiologie ont montré que la population a souvent été exposée à *C. difficile* et à ses toxines par la mise en évidence d'anticorps sériques dirigés contre les toxines. En 1983, Viscidi *et al.* ont déterminé la prévalence des anticorps anti-toxines au sein

de la population sur 340 personnes d'âge compris entre une semaine et 79 ans (Viscidi *et al.*, 1983). Parmi les sérums testés par ELISA « *Enzyme-linked immunosorbent assay* », des IgG anti-TcdA étaient présentes chez 33% des nourrissons de moins de 6 mois et 11% avaient des IgG anti-TcdB. D'autre part, 64 % des patients âgés de plus de deux ans avaient des IgG anti-TcdA et des IgG anti-TcdB étaient présentes chez 66 % des patients âgés de plus de six mois (Viscidi *et al.*, 1983). De plus, dans la partie des patients ICD, ils ont montré que ces anticorps avaient un pouvoir neutralisant de l'effet cytotoxique des toxines. En outre, les patients ICD convalescents avaient des taux d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB significativement supérieurs à ceux de la population générale. 10 sur 16 patients ICD avaient des IgM anti-TcdA et anti-TcdB. Par ailleurs, la prévalence de ces anticorps augmente avec l'âge aussi bien pour TcdA que pour TcdB suggérant une exposition répétée de la population à *C. difficile* (Viscidi *et al.*, 1983). Les données obtenues par Viscidi *et al.* suggèrent que nous sommes dès le plus jeune âge exposés à *C. difficile* et à ses toxines, comme en atteste la production des anticorps dirigés contre les toxines de *C. difficile*.

De même, Bacon et Fekety ont détecté par ELISA des IgG anti-TcdA et anti-TcdB dans 24 % (46/185) des échantillons de sang de la population générale. Par contre, les anticorps présent dans les sérums de la population n'ont montré aucune activité neutralisante (Bacon and Fekety, 1994).

Quelques études ont évalué le rôle des anticorps dirigés contre les toxines de *C. difficile* dans la protection contre la progression de la colonisation vers l'infection chez l'Homme.

En 1992, Johnson *et al.* ont comparé le taux d'IgG anti-TcdA chez les patients ICD diarrhéiques aux patients colonisés mais asymptomatiques ou au groupe de témoins non colonisés au moment des essais. Les auteurs ont obtenu des taux d'IgG significativement plus élevés chez les patients convalescents par rapport aux patients avec une infection aiguë. De plus, les taux d'IgG anti-TcdA étaient plus faibles chez les patients asymptomatiques en comparaison des patients diarrhéiques mais plus élevés que ceux observés chez les témoins non colonisés. Par ailleurs, quelques sérums de patients convalescents (5/14) ont montré une activité neutralisante sur l'effet cytotoxique de la toxine par rapport aux patients diarrhéiques (1/18). Enfin, le taux de neutralisation était plus important avec les sérums de patients asymptomatiques (Johnson *et al.*, 1992).

En 1993, Milligan *et al.* ont comparé le taux d'IgM chez les patients asymptomatiques par rapport aux patients symptomatiques et aux témoins non infectés au moment de l'essai. Ils ont obtenu des titres sur la base des densités optiques (DO) par ELISA significativement plus élevés chez les patients asymptomatiques que chez les patients symptomatiques (Mulligan *et al.*, 1993).

De même, Kyne *et al.* ont montré que les patients hospitalisés avec une colonisation asymptomatique par *C. difficile* avaient des taux d'IgG anti-TcdA plus élevés que ceux observés

chez les patients diarrhéiques (Kyne *et al.*, 2000). Contrairement aux études de Kyne *et al.*, Loo *et al.*, ont détecté un taux plus élevé d'IgG anti-TcdB chez les patients porteurs asymptomatiques par rapport aux patients ayant déclaré une ICD à l'admission à l'hôpital, suggérant une exposition pendant les hospitalisations antérieures (Loo *et al.*, 2011).

En accord avec les observations de Viscidi *et al.*, Johnson *et al.* ont montré que la population générale possède des anticorps dirigés contre les toxines de *C. difficile*. Cependant, peu d'études ont montré le rôle protecteur de ces anticorps sur la progression de la colonisation vers l'infection. Milligan *et al.*, de même que Kyne *et al.* ont obtenu des taux d'IgM et d'IgG anti-TcdA significativement plus élevés chez des patients asymptomatiques par rapport aux patients ICD. Ces données suggèrent qu'un taux élevé d'anticorps serait protecteur du développement de l'infection. Cependant, les données de Johnson *et al.* ne confirment pas ces observations, bien que les sérums des patients asymptomatiques aient une neutralisation plus importante par rapport aux patients convalescents. Le portage asymptomatique serait peut-être lié à l'effet neutralisant des anticorps mais aussi à des facteurs physiologiques de l'hôte.

Rôle des anticorps sériques dans la récurrence des ICD

Des études suggèrent que l'évolution péjorative de l'infection semble être corrélée à de faibles taux des anticorps sériques et coliques de l'hôte dirigés contre les toxines TcdA et TcdB de *C. difficile* et à l'absence de pouvoir neutralisant de ces anticorps.

En effet, en 2001, Kyne *et al.* ont détecté des taux d'IgM et d'IgG anti-TcdA significativement plus faibles chez patients ICD présentant des récurrences par rapport aux patients avec un seul épisode d'ICD au 12^{ème} jour après l'apparition de la diarrhée suggérant que de faibles taux d'IgM et d'IgG anti-TcdA seraient associés à la survenue d'une récurrence (Kyne *et al.*, 2001).

Ensuite, une étude a comparé les réponses de différentes sous-classes d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB chez 13 patients ICD présentant une récurrence par rapport à 13 patients ayant déclaré un seul épisode d'ICD. Ils ont observé des taux d'IgG2 et d'IgG3 anti-TcdA significativement plus faibles chez les patients récidivants par rapport aux patients avec un seul épisode d'ICD. De plus, les taux d'IgG1 et d'IgG4 anti-TcdA et anti-TcdB étaient similaires dans les deux groupes (Katchar *et al.*, 2007).

Par ailleurs, Wullt *et al.* ont évalué les taux d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB chez des patients ICD (âgés de 20 à 85 ans) par rapport à un groupe contrôle afin de savoir si ces taux pouvaient prédire le risque d'un premier épisode et celui d'une récurrence. Ils ont obtenu des taux plus faibles d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB chez les patients ICD comparativement au groupe contrôle. De plus, le taux d'IgG anti-toxines détecté par ELISA était équivalent entre les patients guéris et ceux qui présentaient une récurrence. Enfin, ils ont montré que le faible taux d'anticorps anti-

toxines serait un facteur de risque de l'ICD notamment chez les jeunes adultes (Wullt *et al.*, 2012).

En 2013, Solomon *et al.* ont évalué le rôle de la réponse immune humorale dans le risque de mortalité associée aux ICD. Les auteurs ont détecté les taux d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB dans les sérums de 150 patients prélevés à J1, J3 et J12 après l'infection. Ils ont montré que les patients présentant un taux significativement faible de ces anticorps étaient susceptibles de mourir dans les 30 jours suivant le diagnostic d'ICD. Contrairement aux études précédentes, aucune corrélation n'a été obtenue entre les taux d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB sériques et la survenue de récurrence (Solomon *et al.*, 2013).

Bauer *et al.* ont évalué la corrélation entre la réponse immune humorale et l'évolution de l'ICD en comparant les taux d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB dans les sérums de patients avec un seul épisode déclaré d'ICD et ceux ayant récidivé. Ils ont montré qu'un faible taux d'IgG anti-TcdA et anti-TcdB était associé à la survenue d'une récurrence mais seulement 40% des IgG anti-TcdB avaient un pouvoir neutralisant de l'effet cytopathique de TcdB sur les cellules 3T3 dérivées de fibroblastes embryonnaires de souris. Néanmoins, cette activité neutralisante n'était pas corrélée à la survenue de récurrence (Bauer *et al.*, 2014).

D'autre part, une étude allemande a quantifié par ELISA les IgG et IgA dirigées contre les toxines TcdA et TcdB chez des donneurs de sang présentant ou non une ICD. Chez la plupart des donneurs (272/397 68,5%), aucun anticorps dirigé contre les toxines n'a été détecté. De plus, certains donneurs avec une ICD n'avaient pas d'anticorps anti-toxine détectables par ELISA. Cependant, chez les donneurs présentant une ICD pour lesquels une réponse anti-toxine a été détectée, les auteurs ont observé une prédominance d'IgG et d'IgA sériques dirigées contre TcdB (40%) par rapport à TcdA (12%). Enfin, les anticorps produits n'étaient pas neutralisants et aucune corrélation entre le taux d'anticorps et l'évolution de l'infection n'a pu être démontrée (von Eichel-Streiber *et al.*, 2016).

Enfin, une récente étude de Gilbert *et al.* a évalué la corrélation entre le taux d'anticorps et le risque de récurrence dans des sérums de 275 patients prélevés 48h après le diagnostic positif d'une ICD. Sur 174 patients suivis, 36 ont eu une récurrence et les taux d'IgG anti-TcdA détectés étaient équivalents dans les sérums de patients avec un seul épisode d'ICD et ceux des patients présentant une récurrence. De même, les taux d'IgG anti-TcdB étaient équivalents dans les groupes testés mais significativement plus élevés par rapport aux taux d'IgG anti-TcdA. De plus, les taux faibles d'IgG anti-TcdA étaient associés à un risque de récurrence comme observé dans les études précédentes. Néanmoins, les anticorps ont été détectés dans les sérums prélevés à 48 h post-diagnostic, suggérant que ces prélèvements n'étaient peut-être pas adaptés pour pouvoir démontrer une protection ou prédire le risque de récurrence de l'ICD (Gilbert *et al.*, 2021).

Bien que toutes ces études aient pu établir une corrélation entre le taux d'anticorps et l'évolution de l'infection, les données n'en restent pas moins hétérogènes notamment sur les anticorps anti-TcdB. Ainsi, ils montrent que les patients porteurs asymptomatiques ont des taux d'IgG anti-TcdA plus élevés par rapport aux patients ICD et que les taux faibles d'IgG anti-TcdA seraient associés à la survenue de récurrence.

Rôle de l'immunité mucoale dans l'évolution des ICD

Comme décrit dans les généralités sur la réponse immune, les IgA sécrétoires confèrent une large protection contre les pathogènes opportunistes du microbiote intestinal dont *C. difficile*. Toutefois, peu de données ont été publiées sur le rôle des IgA dans la protection contre les ICD.

Johnson *et al.* ont comparé les taux d'IgA sécrétoires anti-TcdA chez les patients ICD diarrhéiques à ceux de patients asymptomatiques et de témoins non colonisés au moment de l'essai. Les auteurs ont obtenu des taux d'anticorps élevés chez les patients convalescents par rapport à ceux en phase aiguë de l'infection ou à des témoins non colonisés au moment de l'essai. Par ailleurs, les IgA sécrétoires n'avaient aucune activité neutralisante contre l'activité de la toxine A (Johnson *et al.*, 1992). Ils montrèrent plus tard que les IgA sériques, plus particulièrement les IgA de la sous classe 1 (IgA1), avaient une activité neutralisante de l'effet cytotoxique de la toxine A sur les cellules OTF9-63 (cellules de carcinome embryonnaires) (Johnson *et al.*, 1995).

En 1994, Warny *et al.* ont montré que le taux d'IgA fécales anti-TcdA était plus élevé chez les témoins non infectés au moment de l'analyse par rapport aux patients avec un seul épisode d'ICD et encore plus faible chez les patients présentant des récurrences (Warny *et al.*, 1994), suggérant qu'un taux faible d'IgA était associé à la survenue d'une récurrence.

Plus tard en 2006, Johal *et al.* ont montré que le nombre de plasmocytes retrouvés au niveau colique et le taux d'IgA fécales étaient faibles chez les patients ICD et encore plus faibles chez les patients ayant une colite pseudomembraneuse par rapport aux témoins. Ces faibles taux étaient associés à des risques de récurrence de l'ICD plus importants comme déjà observé par Warny *et al.* (Johal *et al.*, 2004).

Récemment, von Eichel-Streiber *et al.* ont montré que les taux d'IgA fécales anti-TcdA étaient plus élevés que ceux d'IgA anti-TcdB chez des patients présentant une ICD. En concordance avec les études précédentes, ils ont montré qu'un faible taux d'IgA anti-TcdA était associé à un risque de récurrence (von Eichel-Streiber *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces résultats démontrent que les anticorps sériques et mucoaux dirigés contre les toxines jouent un rôle important dans l'évolution de l'ICD. Par contre, les données obtenues sont assez hétérogènes, ce qui rend complexe l'interprétation des résultats de la réponse

immune adaptative dirigée contre les toxines de *C. difficile*. Par conséquent, la réponse immune seule ne permet pas de prédire de manière adéquate l'évolution de l'infection notamment dans le cas des récives chez des patients dont l'historique de l'infection n'est pas toujours connu. Toutefois, comparativement aux IgG, les données sur les IgA semblent plus cohérentes et plus prédictives dans l'évolution des ICD, bien qu'elles soient peu étudiées. Enfin, l'action neutralisante de ces anticorps est variable car certains anticorps produits ne sont pas efficaces. L'hétérogénéité dans les données sur le pouvoir neutralisant des anticorps anti-TcdA et anti-TcdB peut être due à la différence physiologique des deux toxines puisque TcdB serait 1000 fois plus cytotoxique que TcdA (Chaves-Olarte *et al.*, 1997).

b) La réponse immune adaptative dirigée contre les protéines de surface de *C. difficile*

De même que les toxines, des anticorps peuvent être spécifiquement produits contre les facteurs de surface de *C. difficile*. Cependant, peu d'études ont évalué leur contribution dans la protection contre l'infection et leur évolution dans les ICD.

En 1989, pour la première fois, Pantosti *et al.* ont détecté par immunoblot des IgG dirigées contre les protéines totales de la surface de *C. difficile* dans les sérums de 16 patients présentant une ICD en phase aigüe ou en phase de convalescence (Pantosti *et al.*, 1989). Ils ont montré que 8/16 (50%) des sérums testés avaient des anticorps dirigés contre les protéines totales de surface. Ils ont également observé une augmentation de la réponse dirigée contre les protéines totales de surface entre la phase aigüe et la phase de convalescence chez 6/8 patients. Deux patients ayant montré une réponse très importante dans le sérum en phase convalescente ont malgré tout présenté une récive. Enfin, 7/8 des patients avaient des anticorps qui reconnaissaient une protéine de 35 kDa qui pourrait correspondre à la sous-unité LMW de SlpA (Pantosti *et al.*, 1989).

De même, Milligan *et al.* ont quantifié les taux d'IgA et d'IgM dirigés contre les antigènes de la surface de *C. difficile*. Ils ont montré que les taux de ces anticorps étaient plus élevés chez les patients asymptomatiques par rapport aux patients présentant une ICD (Mulligan *et al.*, 1993).

En ce qui concerne la réponse des anticorps dirigée contre les SLPs, Drudy *et al.* ont détecté par ELISA les taux d'IgM, d'IgG ou d'IgA contre les SLPs dans les sérums d'une cohorte de patients ICD, de patients asymptomatiques et un groupe contrôle de patients non colonisés par *C. difficile* au moment de l'essai. Ils n'ont obtenu aucune différence significative entre les taux d'IgM, d'IgG ou d'IgA dans tous les groupes testés. Drudy *et al.* ont comparé le taux d'IgM chez les patients avec une ICD simple ou avec une récive et ont obtenu un taux d'IgM anti-SlpA significativement plus faible chez les patients présentant des récives que chez les

patients présentant une ICD simple (Drudy *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été montré que les sérums de patients ICD présentaient des taux d'IgG anti-SLPs significativement plus élevés que les sérums de porteurs asymptomatiques ou de témoins non colonisés par *C. difficile* au moment de l'essai (Sánchez-Hurtado *et al.*, 2008). Dans une autre étude réalisée dans une cohorte de patients ICD, les auteurs ont comparé par ELISA les taux d'IgM et d'IgG anti-SlpA dans les sérums de patients en phase précoce de l'ICD présentant un seul épisode d'ICD, des patients ayant fait des récurrences et des témoins non infectés par *C. difficile* au moment des essais (Mizrahi *et al.*, 2018). Il n'a pas été observé de différence significative entre les taux d'IgM anti-SlpA dans les différents groupes. En revanche, les taux d'IgG anti-SlpA étaient significativement plus élevés dans le groupe de patients présentant un seul épisode d'ICD durant la phase précoce de l'infection par rapport aux patients présentant un ou plusieurs récurrences et aux témoins non colonisés par *C. difficile* (Mizrahi *et al.*, 2018).

Par ailleurs, des taux d'anticorps ont été détectés contre les protéines de surface Cwp66, FbpA, Cwp84, FliC et FliD dans les sérums prélevés une à trois semaines après le diagnostic chez des patients présentant une ICD par rapport aux patients non colonisés au moment des essais. Les auteurs ont observé que ces taux étaient plus faibles dans les sérums de patients présentant une ICD par rapport aux patients non colonisés au moment des essais (Péchiné *et al.*, 2005a). Ils confirmeront plus tard que les anticorps dirigés contre FliC et FliD peuvent être encore détectés dans les sérums deux semaines après le diagnostic de l'ICD, suggérant que ces protéines sont activement exprimées au cours de l'infection (Péchiné *et al.*, 2005b).

L'ensemble de ces résultats montrent que les protéines de surface sont capables d'induire une réponse immunitaire adaptative spécifique et sont susceptibles de jouer un rôle important dans l'évolution vers l'infection par *C. difficile* même si cette protection n'a que très peu été étudiée chez l'Homme.

C. Modèles expérimentaux d'étude de la physiopathologie des infections à *Clostridioides difficile*

De nombreux modèles expérimentaux ont été utilisés pour l'étude de la physiopathologie des ICD notamment chez les cochons d'Inde, les lapins, les porcelets et les rats. Mais les plus utilisés sont les modèles de colonisation et d'infection chez la souris et chez le hamster (Best *et al.*, 2012). Ces modèles sont basés sur la perturbation préalable du microbiote digestif par l'administration d'un cocktail d'antibiotiques par voie orale suivi d'une dose de clindamycine par voie intrapéritonéale ou l'administration de la clindamycine ou de la céfopérazone seules.

Le modèle hamster

Le hamster en particulier le hamster doré Syrien est le plus utilisé comme modèle d'infection car cette espèce est extrêmement sensible aux toxines de *C. difficile*. Chez le hamster les lésions intestinales sont principalement localisées au niveau du cæcum et non dans le colon comme chez l'Homme. Il reproduit les formes sévères et compliquées qui peuvent être observées dans certains cas chez l'Homme. En raison de l'évolution fulminante de l'infection, ce modèle ne permet pas de suivre l'évolution de l'infection. Ce modèle est donc utilisé pour l'étude des infections aiguës de la colonisation à la transmission, l'étude de l'importance des facteurs de virulence et permet d'évaluer l'efficacité de candidats vaccins et de nouvelles cibles thérapeutiques (Best *et al.*, 2012).

Le modèle souris

Contrairement au hamster, le modèle souris permet d'étudier les situations allant de la colonisation simple à l'infection spontanément résolutive qui sont observées chez l'Homme et qui sont plus difficiles à évaluer chez le hamster. On peut évaluer chez les souris la colonisation asymptomatique, étudier la mise en place de la réponse immune et la modulation du microbiote intestinal dans un modèle de récurrence simple ou multiple.

Plusieurs modèles de colonisation et d'infection par *C. difficile* ont été proposés chez la souris (Chen *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011). Parmi les modèles proposés celui utilisé dans cette thèse est le modèle élaboré et évalué par Chen *et al.*, (Chen *et al.*, 2008). Il repose sur l'induction de la dysbiose du microbiote intestinal par un prétraitement de 5 jours incluant 3 jours d'exposition à un cocktail d'antibiotiques administrés en eau de boisson contenant : la kanamycine (0,4 mg/mL), la gentamicine (0,035 mg/mL), la colistine (850 UI/mL), le métronidazole (0,215 mg/mL), et la vancomycine (0,045 mg/mL) puis un arrêt de l'exposition aux antibiotiques pendant deux jours avant une injection intrapéritonéale de clindamycine (10mg/kg) la veille de l'infection par gavage d'une souche toxigène de *C. difficile* (par exemple les souches de référence 630, 630 Δ *erm*, VPI10463 ou la souche épidémiologique R20291). Ce prétraitement conduisait à 96% de souris symptomatiques dans les 4 premiers jours après l'infection avec un pic de l'infection au deuxième jour sans décès et permet de se rapprocher le plus de l'évolution de l'ICD simple observée chez l'Homme (Chen *et al.*, 2008). Les modèles utilisés peuvent cependant être influencés par les différences qualitatives (infections par des spores ou formes des végétatives) et quantitatives de l'inoculum et le choix de la souche de *C. difficile* utilisée (Chen *et al.*, 2008).

Outre les modèles animaux de nombreuses études ont été réalisées en utilisant des lignées cellulaires. Quelques exemples de ces usages seront notamment détaillés dans les paragraphes traitant de la réponse immune.

1. Comparaison du modèle souris par rapport à l'Homme

1.1. Comparaison du microbiote intestinal

Pour l'analyse du microbiote, il existe plusieurs modèles d'étude chez la souris, le rat, le cochon (Hillman *et al.*, 2017). Nous allons nous focaliser sur le modèle souris. En effet, de nombreuses recherches biomédicales se basent très souvent sur des modèles souris ce qui permet d'extrapoler les résultats obtenus chez l'homme compte tenu des similarités au niveau physiologique et génétique. Xiao *et al.* ont établi le catalogue du microbiome intestinal provenant des échantillons fécaux de 184 souris. Les auteurs ont montré que, tout comme chez l'Homme, les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Protéobactéries représentent 70% de la composition du microbiote intestinal chez la souris (Xiao *et al.*, 2015). En plus, 13 sur 20 genres les plus présents chez l'Homme sont également retrouvés chez la souris (Figure 42).

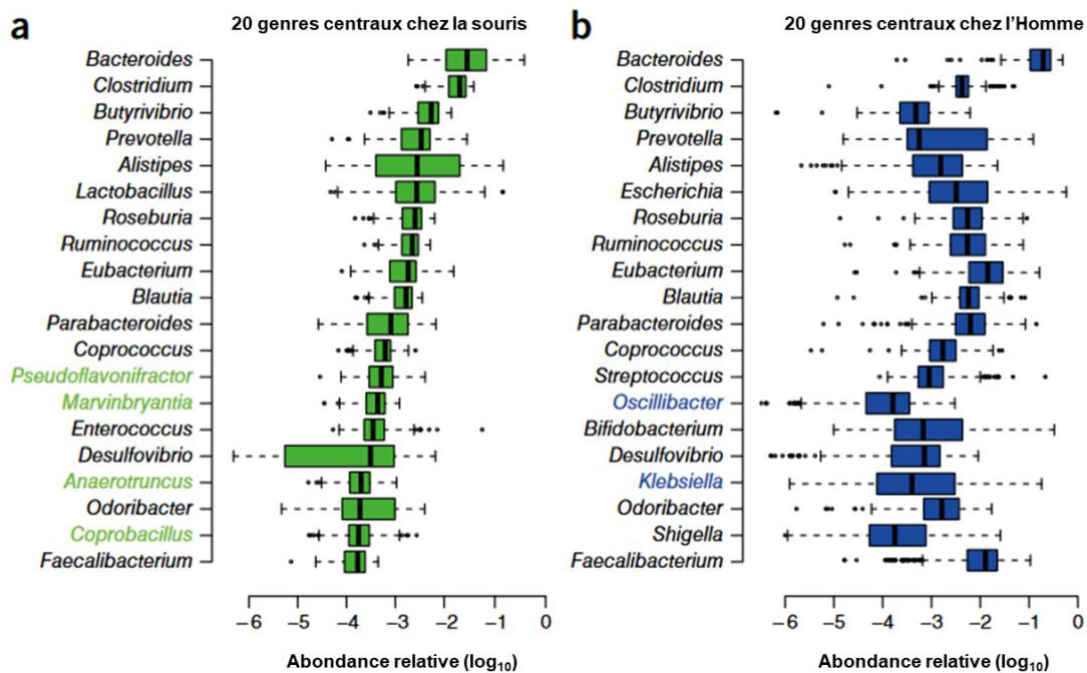


Figure 42 : Liste des 20 genres centraux retrouvés dans les échantillons fécaux chez la souris (a) et chez l'Homme (b).

D'après (Xiao *et al.*, 2015).

Ley *et al.* ont montré que 85% des bactéries trouvées chez la souris ne le sont pas chez l'Homme, suggérant une spécificité de la composition microbienne de la souris (Ley *et al.*, 2005). De plus, une analyse exploratoire réalisée par Nguyen *et al.* comparant le microbiote de la souris à celui de l'Homme a montré une différence d'abondance des genres bactériens. Ils ont observé une augmentation des genres *Faecalibacterium*, *Prevotella* et *Ruminococcus* chez l'Homme alors que chez la souris les genres les plus abondants sont les *Lactobacillus*, *Alistipes*

et *Turicibacter*. Néanmoins, les *Clostridium*, les *Bacteroides* et les *Blautia* ont une abondance relative équivalente dans les deux espèces (Nguyen *et al.*, 2015). Récemment, un catalogue presque complet du métagénome du microbiote de la souris a été généré à partir des échantillons de selles et du cæcum de souris. Ceci a permis de montrer une équivalence de 80% au niveau de la famille, 62 % au niveau des genres bactériens entre le microbiote de l'Homme et celui de la souris avec seulement 10,8% d'équivalence au niveau des espèces bactériennes (Kieser *et al.*, 2022). Ainsi, bien qu'il y ait des similarités entre la souris et l'Homme, la composition du microbiote intestinal n'est pas équivalente. Cependant, malgré ces différences, les facteurs métaboliques sont conservés et équivalents entre les deux espèces (Xiao *et al.*, 2015).

De ce fait, l'utilisation d'un modèle souris pour l'analyse du microbiote intestinal dans le but d'extrapoler les données chez l'Homme et élaborer des stratégies thérapeutiques présente des avantages et des limites qui sont rassemblées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Les avantages et les limites du modèle souris pour l'étude du microbiote intestinal.

Adapté de (Nguyen *et al.*, 2015)

Avantages	Limites
Permet des interventions qui ne sont pas possibles chez l'Homme	Quelques différences anatomiques, génétiques et physiologiques avec l'Homme et par conséquent les modèles murins ne peuvent pas récapituler entièrement les systèmes humains
Faible coût d'entretien, taux de reproductibilité élevé et cycle de vie court	
Connaissance approfondie de la génétique de la souris	
Possibilité d'utiliser des souris génétiquement modifiées	Différents modèles d'études du microbiote peuvent conduire à différents résultats
Permet de cibler les gènes ou des interactions spécifiques avec l'hôte	Interaction hôte-microbiote intestinal est spécifique à l'hôte donc possibilité de ne pas réussir à extrapoler les données observées chez la souris à l'Homme
Utilisation des modèles de souris consanguines avec un fond génétique homogène (C57BL/6, BALB/c) permet de déterminer les interactions microbiote-bactérie-hôte et d'améliorer la reproductibilité de l'expérimentation	L'homogénéité génétique implique que les souches de souris consanguines ne peuvent pas montrer les variations génétiques inhérentes à la population humaine.
	Microbiote différent en fonction de la lignée de souris
Possibilité de contrôler le régime alimentaire, les conditions d'hébergement pour limiter les impacts de l'environnement sur le microbiote	Absence de facteurs permettant la diversification du microbiote de l'Homme chez la souris implique que les modèles souris ne peuvent pas réellement refléter le microbiote intestinal de l'Homme

Pour s'affranchir des différentes limites liées au modèle souris, de plus en plus d'études se basent sur des modèles de souris à microbiote humanisé qui consistent à transplanter une composition de bactéries ou un microbiote fécal complet humain à des souris « *Germ-free* » (Park and Im, 2020).

1.2. Comparaison de la synthèse des acides biliaires

Chez la souris, environ 1,25 mg de cholestérol sont convertis en acides biliaires. Tout comme chez l'Homme, la synthèse des acides biliaires primaires se fait par la voie classique et par la voie alternative. Cependant, chez la souris, le CA et l'acide alpha et bêta muricholique (α -MCA et β -MCA) dérivés du CDCA sont les acides biliaires primaires majoritaires issus de la synthèse du cholestérol (Li and Dawson, 2019) (Figure 43).

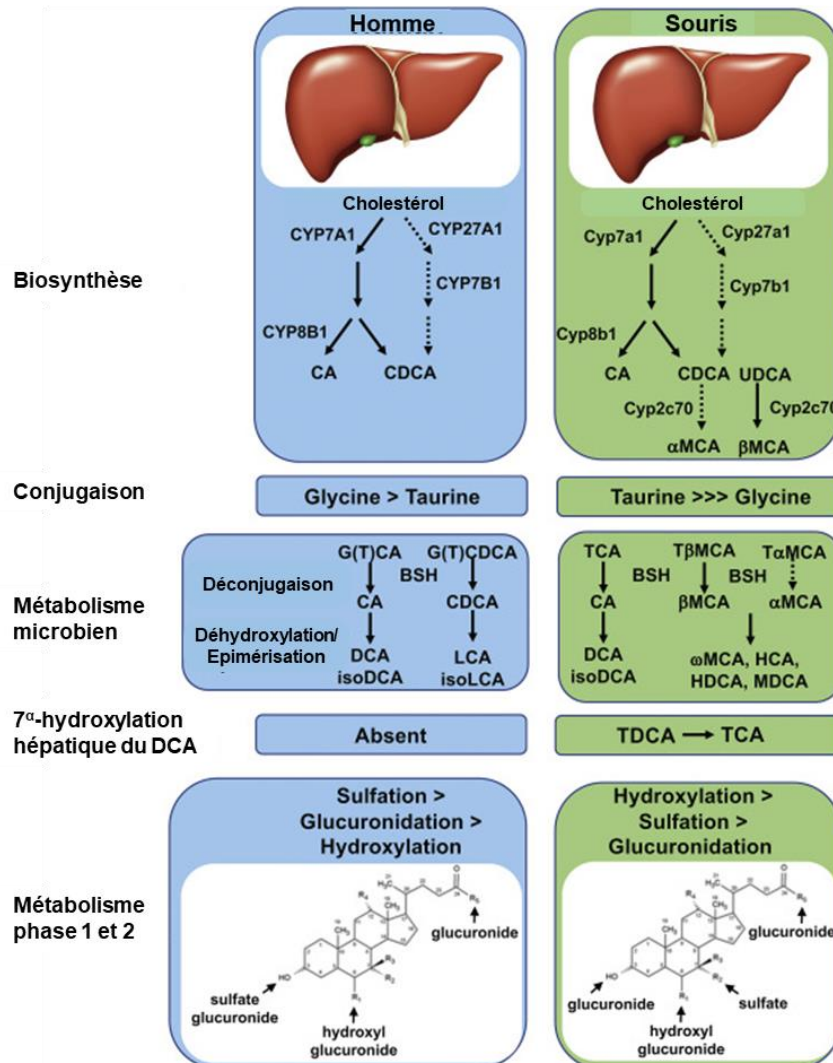


Figure 43 : La synthèse des acides biliaires primaires et secondaires retrouvé chez l'Homme et la souris.

CA : acide cholique ; CDCA : acide chénodésoxycholique ; DCA : acide désoxycholique ; LCA : acide lithocholique ; UDCA : acide ursodésoxycholique ; TCA : acide taucholique, TDCA : acide taurodésoxycholique ; GCA : acide glucocholique ; ω MCA : acide omega muricholique ; HCA : acide hyocholique ; HDCA : acide hydodésoxycholique ; MDCA : acide muridésoxycholique. Adaptée de (Li and Dawson, 2019).

Les acides biliaires primaires α -MCA et β -MCA sont également présent chez l'Homme en faible quantité, (García-Cañaveras *et al.*, 2012). Contrairement à l'Homme, les acides biliaires primaires sont majoritairement conjugués à la taurine pour former l'acide tauromuricholique (T α MCA et T β MCA). L'UDCA chez la souris est un acide biliaire primaire généré par le CDCA indépendamment du microbiote. Les souris peuvent hydroxyler l'UDCA pour former le β -MCA. Par conséquent l'UDCA servant d'intermédiaire pour la production du MCA est très faiblement retrouvé dans les selles des souris (Figure 43) (Li and Dawson, 2019).

Par le même mécanisme que chez l'Homme, le CA des souris est biotransformé en DCA par le microbiote intestinal. Les acides biliaires primaires α -MCA et β -MCA vont générer l'acide oméga muricholique (ω -MCA) et de faible quantité d'acide hydrodésoxycholique (HDCA) et d'acide muridésoxycholique (MDCA) (Li and Dawson, 2019).

2. Etude du microbiote dans les ICD chez la souris

L'altération du microbiote représente un prérequis pour l'implantation de *C. difficile* et le développement de l'infection à *C. difficile*. Bien qu'il y ait des différences avec ce qui se passe chez l'Homme, les modèles animaux d'infection par *C. difficile* ont permis de déterminer différents marqueurs qui favorisent l'implantation et la germination des spores de *C. difficile* jusqu'à l'apparition des signes cliniques de l'infection de même que ceux qui empêchent la colonisation par *C. difficile*.

Les marqueurs d'implantation de *C. difficile* chez la souris

Dans une étude réalisée par Reeves *et al.*, les auteurs ont comparé l'impact du cocktail d'antibiotiques seul ou associé à la clindamycine versus la dysbiose induite par la clindamycine seule, ou par la céfopérazone sur l'interaction entre le microbiote et la dynamique de l'infection (Chen *et al.*, 2008; Reeves *et al.*, 2011). Ils ont montré qu'un cocktail d'antibiotiques seul n'induit pas une ICD sévère chez les souris en comparaison des groupes traités par un cocktail d'antibiotiques suivi d'une dose de clindamycine ou l'administration de la clindamycine seule (Chen *et al.*, 2008; Reeves *et al.*, 2011). Il a été observé une diminution des *Lachnospiraceae* au profit des *Lactobacillaceae* avec le cocktail d'antibiotiques. En revanche, avec la clindamycine seule, on a une prédominance des Protéobactéries notamment des *Enterobacteriaceae*. L'administration d'une dose de clindamycine après le cocktail d'antibiotiques conduit au même profil que celui de la clindamycine seule c'est-à-dire une prédominance des Protéobactéries dans le microbiote des souris (Reeves *et al.*, 2011). Ceci suggère que l'association d'un cocktail d'antibiotiques et d'une dose clindamycine perturbe fortement le microbiote rendant ainsi les souris plus susceptibles à la colonisation et à l'infection par *C. difficile*.

D'autre part, avec la céfopérazone, les auteurs ont observé une prédominance de la famille des *Pseudomonaceae* et l'administration de la clindamycine après un traitement par la céfopérazone conduit à une prédominance des *Lactobacillaceae* (Reeves *et al.*, 2011). De plus, les souris traitées par la céfopérazone étaient plus susceptibles à l'infection par *C. difficile* que par le cocktail d'antibiotiques seul. La résilience du microbiote a été observée 14 jours après l'arrêt du traitement par le cocktail d'antibiotiques mais celle-ci était incomplète. Enfin, la clairance de *C. difficile* observée dans cette étude a été associée à la réapparition des Firmicutes et des Bacteroidetes.

Ces résultats suggèrent que la susceptibilité de l'infection à *C. difficile* dépend de l'impact de l'antibiotique sur le microbiote. Ceci confirme que le risque de la survenue de l'ICD est différent selon l'antibiotique inducteur utilisé pour provoquer une dysbiose (Reeves *et al.*, 2011). De ce fait, le choix du modèle va dépendre de la question biologique posée.

Tout comme Reeves *et al.*, Buffie *et al.* ont montré que l'administration de la clindamycine conduit à une prédominance des Proteobacteria notamment les *Enterobacteriaceae* avec une forte diminution des *Bifidobacterium*, des *Clostridium* et des *Bacteroides* (Buffie *et al.*, 2012).

Par ailleurs, des études chez la souris ont montré que des bactéries du microbiote comme les *Enterococcus spp*, *Helicobacter* et *Klebsiella* contribuent à la sévérité de l'infection. Si on prend l'exemple d'*Enterococcus*, Smith *et al.* ont montré qu'une déplétion des *Enterococcus* par des antibiotiques était associée à un retard dans la colonisation par *C. difficile* (Smith *et al.*, 2022). L'administration d'*Enterococcus faecalis* aux souris avant l'ICD (jour 1 post-infection) a permis de rétablir la colonisation par *C. difficile*. De plus, les auteurs ont montré que les souris infectées par *C. difficile* et *E. faecalis* avaient des taux de toxines fécales significativement plus élevés par rapport aux souris infectées uniquement par *C. difficile*. Les données de Smith *et al.* chez la souris suggèrent que *E. faecalis* stimulerait le processus infectieux de *C. difficile* en augmentant la production de ses toxines (Smith *et al.*, 2022).

Ainsi, la dysbiose induite par les antibiotiques dans les modèles *in vivo* utilisés conduit à une diminution des Firmicutes et des Bacteroidetes et une augmentation des Protéobactéries notamment les *Enterobacteriaceae* et les *Enterococcus spp*. Cette altération spécifique du microbiote chez la souris a été associée à la perte de la résistance à la colonisation par *C. difficile*. De plus, l'impact de ces antibiotiques semble durable et rend susceptible au développement des ICD même après l'arrêt de l'utilisation de ces antibiotiques chez la souris, ce qui pourrait expliquer la possibilité de récurrence de l'infection à distance.

Les marqueurs de résistance à l'ICD chez la souris

Tout comme les marqueurs permettant l'implantation de *C. difficile* dans le microbiote intestinal, il existe aussi des marqueurs favorisant la résistance à la colonisation par *C. difficile*, en voici quelques exemples.

Deng *et al.*, ont montré que pour des souris traitées en prophylaxie par la souche ZY-312 de *Bacteroides Fragilis*, il avait été observé une amélioration des signes cliniques avec un faible pourcentage de mortalité après une infection induite par la souche de référence de VPI 10463 de *C. difficile* par rapport aux souris non traitées (Deng *et al.*, 2018). De plus, l'analyse histopathologique du cæcum et du côlon a montré une barrière intestinale intacte. L'analyse du microbiote rapporte une augmentation d'*Akkermansia muciniphila* chez les souris traitées par *B. fragilis*. Enfin, les auteurs ont montré *in vitro* que *B. fragilis* inhibe l'adhésion de *C. difficile* sur des cellules HT-29 (Deng *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent que la souche ZY-312 de *B. fragilis* préviendrait l'infection contre *C. difficile* en inhibant la colonisation par *C. difficile* via l'adhésion aux cellules épithéliales et en atténuant l'altération de la barrière intestinale par la modulation du microbiote.

Par ailleurs, Wu *et al.* ont montré que l'administration de *A. muciniphila* à des souris infectées par *C. difficile* réduit significativement la perte de poids (un des signes cliniques liés à la phase aiguë de l'ICD dans un modèle souris) ainsi que les lésions du côlon. Ces auteurs ont montré que le traitement par *A. muciniphila* induit une faible prévalence de *Enterococcus* et *Escherichia-Shigella* et une augmentation de l'abondance relative de *Blautia* et *Parabacteroides* (Wu *et al.*, 2022). La présence de ces genres bactériens est associée à une amélioration des fonctions de barrière du microbiote. De plus, ils ont montré que le traitement par *A. muciniphila* a permis de restaurer la proportion des acides biliaires secondaires par rapport aux souris non traitées alors que la prédominance des acides biliaires primaires est associée aux symptômes de l'ICD (Wu *et al.*, 2022).

Enfin, Ghimire *et al.* ont réalisé un screening de plusieurs souches isolées par culturomique puis identifiées par MALDI-TOF-MS et par le profilage du gène codant l'ARNr 16S dans le but de déterminer les souches inhibitrices de *C. difficile* (Ghimire *et al.*, 2020). Les auteurs ont montré que tous les *Bifidobacterium* testés dans cette étude sont capables d'inhiber *C. difficile* avec une efficacité plus importante avec la souche SG-742 de *B. adolescentis*. De même, les *Lachnospiraceae* ont montré une forte inhibition de *C. difficile* (Ghimire *et al.*, 2020). En effet, Reeves *et al.* ont montré que la présence des *Lachnospiraceae* dans le microbiote serait associée à la clairance de *C. difficile* et à la suppression de la production de ses toxines (Reeves *et al.*, 2012). La plupart des inhibiteurs de *C. difficile* sont des producteurs d'acétate et de butyrate (Ghimire *et al.*, 2020).

Ces bactéries améliorent les symptômes des ICD en modulant la fonction de barrière et de maintien du microbiote intestinal, la fonction immunologique et le profil métabolique. Par conséquent, ces bactéries pourraient être des candidats pour la prévention des ICD. Des préparations de différents consortia bactériens bien définis pourraient être utilisées pour inhiber la croissance de *C. difficile*. Ainsi des souches des genres *Bifiobacterium*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides* sont des candidats testés comme probiotiques.

3. Etude des acides biliaires dans les ICD chez la souris

Puisqu'il a été démontré chez l'Homme et dans des modèles animaux que l'altération du microbiote intestinal par les antibiotiques altère également le métabolome intestinal, des études ont évalué les métabolites impliqués dans la croissance de *C. difficile* et le développement des ICD.

Dans ce contexte, Theriot *et al.* ont évalué la corrélation entre la susceptibilité à l'ICD et l'altération du microbiote et du métabolome intestinal dans un modèle d'infection chez la souris préalablement traitées par la céfopérazone. La susceptibilité à l'ICD est associée à une augmentation des acides biliaires primaires dont le TCA (Theriot *et al.*, 2014). De plus, les auteurs ont montré que le traitement par les antibiotiques avait réduit significativement la quantité des acides biliaires secondaires dont le DCA qui n'est plus détectable (Theriot *et al.*, 2014).

Une perturbation dans la composition des acides biliaires coliques favoriserait donc un environnement propice pour la croissance de *C. difficile*. En effet, Thériot *et al.* ont évalué les concentrations physiologiques des acides biliaires primaires et secondaires dans l'intestin grêle et dans le gros intestin chez des souris traitées soit par la céfopérazone, la clindamycine ou par la vancomycine. Après le traitement par les antibiotiques, une perte significative du DCA, LCA, UDCA, HDCA et ω MCA a été observée dans le gros intestin. Les auteurs ont pu corréler cette perte en acides biliaires secondaires à la diminution des *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* alors que les *Lactobacillaceae* et les *Enterobacteriaceae* sont corrélés négativement aux acides biliaires secondaires. En effet, les espèces possédant l'activité 7α -déhydroxylase dont les *Clostridium scindens*, *Clostridium hylemonae*, *Clostridium hiranonis*, *Clostridium sordellii* et *Clostridium leptum* appartiennent à la famille des *Ruminococcaceae* et des *Lachnospiraceae* (Mallonee *et al.*, 1990; Wells and Hylemon, 2000; Ridlon *et al.*, 2006, 2010). Par ailleurs, les concentrations physiologiques d'acides biliaires secondaires détectées *in vivo* pendant la résistance à *C. difficile* étaient capables d'inhiber la germination des spores et la croissance de *C. difficile in vitro* (Theriot *et al.*, 2016). Les données de Theriot *et al.* suggèrent que la modification du métabolome intestinal tient une place très importante dans la susceptibilité à la colonisation par *C. difficile*. La perte des espèces impliquées dans la biotransformation des

acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires conduit à un déséquilibre des acides biliaires en faveur des primaires favorisant ainsi la germination des spores de *C. difficile*.

Dans le tableau ci-dessous (Tableau 6) sont récapitulés les acides biliaires impliqués dans le cycle de vie de *C. difficile* et leur action décrite sur la germination des spores et la multiplication bactérienne.

Tableau 6: Les principaux acides biliaires produits chez l'Homme et la souris et leur impact sur *C. difficile*.

Adapté de (Theriot *et al.*, 2016; Thanissery *et al.*, 2017).

Acide biliaire		Type	Espèce	Impact sur <i>C. difficile</i>
Acide cholique	CA	Primaire	Homme, souris	Stimule la germination des spores
Acide taurocholique	TCA	Primaire	Homme, souris	Favorise la germination des spores
Acide glycocholique	GCA	Primaire	Homme	Stimule la germination des spores
Acide chénodésoxycholique	CDCA	Primaire	Homme, souris	Inhibe la germination des spores induit par TCA
Acide désoxycholique	DCA	Secondaire	Homme, souris	Stimule la germination des spores Inhibe la croissance de <i>C. difficile</i>
Acide lithocholique	LCA	Secondaire	Homme	Inhibe la germination des spores
Acide ursodésoxycholique	UDCA	Secondaire	Homme	Inhibe la croissance de <i>C. difficile</i>
Acide ω-muricholique	ω -MCA	Secondaire	Souris	
Acide isodésoxycholique	iDCA	Secondaire	Homme	
Acide hydodésoxycholique	HDCA	Secondaire	Souris	

Outre l'altération indirecte de la biotransformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires par les bactéries du microbiote, les antibiotiques induisent également la perte du métabolisme des glucides, des protéines résultants en l'abondance de ces molécules dans le microbiote et favorisant ainsi la croissance de *C. difficile*. Theriot *et al.* ont montré que

la susceptibilité à l'ICD est également associée à une augmentation des acides aminés et des sucres simples. De plus, les auteurs ont observé une diminution des AGCC et une augmentation des glucides dans le microbiote (Theriot *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que la diminution des bactéries responsables du métabolisme des glucides, des acides aminés, des vitamines, des protéines et des lipides conduisent à un excès de ces nutriments dans le microbiote. La disponibilité de ces nutriments va permettre aux bactéries opportunistes de se développer. En effet, les acides aminés dont la cystéine, l'isoleucine, la proline, la valine de même que les vitamines dont la biotine participent à la croissance de *C. difficile* (Karasawa *et al.*, 1995).

Ces données démontrent le rôle important des acides biliaires primaires dans le cycle de vie de *C. difficile*. Ainsi, l'altération du microbiote intestinal conduit à la diminution des espèces ayant des fonctions métaboliques notamment celles impliquées dans la biotransformation des acides biliaires et dans la fermentation des glucides et par conséquent favorise la croissance de *C. difficile* dans le microbiote. Il est donc important de comprendre la régulation des acides biliaires et des autres métabolites par le microbiote pour le développement des traitements contre l'ICD.

Outre le rôle des acides biliaires dans le cycle de vie de *C. difficile*, il a été montré *in vitro* que le CDCA et le LCA inhibent l'activité des toxines, suggérant un rôle dans la modulation de la virulence de l'infection. Le LCA et le CDCA se lient à TcdB avec une forte affinité et inhibent son activité cytotoxique. Aucun des acides biliaires testés n'a été capable de se lier à TcdA (Tam *et al.*, 2020). Le LCA et le CDCA se lient à TcdB ce qui induit un changement conformationnel de TcdB conduisant à l'inhibition de la liaison de TcdB au récepteur de surface de la cellule HCT 116 de la lignée cellulaire colique humaine. La liaison entre TcdB et les acides biliaires est cependant réversible. De plus, les auteurs ont montré qu'une forme tronquée de TcdB (perte de 83 résidus dans le domaine CROPs) est résistante à son inhibition par les acides biliaires (Tam *et al.*, 2020).

Une récente étude *in vivo* a montré que les acides biliaires extraits de la lumière intestinale et des selles de souris étaient capables d'inhiber l'activité cytotoxique de TcdB de manière dose-dépendante. Ils ont également observé l'effet neutralisant des acides biliaires humains bien qu'il existe une différence entre les acides biliaires de la souris et ceux de l'Homme (Icho *et al.*, 2023).

4. Etude de la réponse immune dans les ICD chez la souris et dans les lignées cellulaires

De nombreuses études ont été réalisées sur le rôle de la réponse immune de l'hôte via les anticorps anti-toxines produits suite à une infection et leur pouvoir neutralisant de l'action de ses toxines. Toutes ces données sont la base de l'élaboration de nouvelles stratégies

d'immunisation passive ou active contre les toxines TcdA et TcdB de *C. difficile* de même que les protéines de surface et bien détaillées dans la revue de (Mizrahi *et al.*, 2014).

4.1. Réponse immune innée

4.1.1. La réponse immune innée induite par les toxines

Comme décrit dans le chapitre sur les rôles du microbiote, l'épithélium intestinal représente la première ligne de défense de l'hôte contre les pathogènes avec la couche de mucus qui crée une barrière physique de défense contre les bactéries de la lumière intestinale.

Une fois la barrière épithéliale altérée, sous l'action des toxines TcdA et TcdB, il s'en suit une production de cytokines dans la lumière intestinale au niveau de l'épithélium conduisant au recrutement des cellules de l'immunité innée notamment les polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. L'ensemble de ces cellules vont activer plusieurs voies de signalisation afin d'éliminer le pathogène (Figure 41).

Il a été montré *in vitro* qu'en réponse à l'altération de la barrière épithéliale sous l'action des toxines TcdA et TcdB, les toxines vont induire la transcription des gènes et la production des médiateurs pro-inflammatoires dont CXCL8, interleukine 8 (IL-8), IL-6, IL-1 β et le TNF- α par les cellules épithéliales (Mahida *et al.*, 1996; Branka *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2013). La production de ces cytokines se fait à travers l'activation des voies de signalisations NF- κ B « *Nuclear factor- κ B* » et AP-1 « *Activator protein 1* » (He *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009). Il a été par exemple montré que les toxines peuvent induire la libération du nucléotide extracellulaire UDP qui est un signal de *stress putatif* qui va se lier au récepteur P2Y6 conduisant à la production de CXCL8 et IL-8 via la voie NF- κ B (Hansen *et al.*, 2013).

CXCL8 et IL-8 vont induire le recrutement de polynucléaires neutrophiles sur le site de l'infection qui seront responsables de la clairance du pathogène par phagocytose. Il a été démontré que la réduction de l'expression de CXCL1 et du recrutement des neutrophiles sont associés à une morbidité et une mortalité plus importante chez des souris Knock-out de récepteur de l'inflammasome (Hasegawa *et al.*, 2011, 2012). Les toxines peuvent également contribuer à la formation et l'activation de l'inflammasome via les récepteurs NOD et ASC à la suite d'une inactivation des GTPases et induire la libération de cytokines IL-23 impliqué dans l'induction des cellules Th17 (Cowardin *et al.*, 2015).

Suite à la rupture des jonctions serrées, les toxines TcdA et TcdB vont atteindre la *lamina propria* et contribuer au recrutement des cellules immunitaires dont les neutrophiles (Hasegawa *et al.*, 2011), les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes (Lee *et al.*, 2009; Mahida *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 1998). Ceci va favoriser une production excessive de cytokines pro-

inflammatoires dont les CXCL8, IL-8, IL-1 β et le TNF- α par les macrophages par exemple et causer des lésions tissulaires plus importantes (Rocha *et al.*, 1998).

Ainsi, les toxines altèrent la barrière épithéliale et induisent la production des cytokines inflammatoires conduisant au recrutement des cellules immunitaires circulantes sur le site de l'infection. Ces cellules vont par ailleurs stimuler la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth afin d'éliminer *C. difficile*. Parmi les peptides sécrétés, on retrouve la cathélicidine LL37 capable d'inhiber la croissance de *C. difficile*. Il a été montré que le cytokine IL-27 produit suite à l'action des toxines, stimule la production de LL37 ce qui aurait un impact sur l'évolution de l'ICD (Xu *et al.*, 2021).

4.1.2. La réponse immune innée induite par les protéines de surface SlpA et FliC

Les protéines de surface dont SlpA, FliC et FliD outre leurs rôles dans l'adhésion de *C. difficile* aux cellules épithéliales de l'hôte comme vu dans le chapitre 1, activent également les éléments du système immunitaire innée avec la sécrétion des cytokines et chémokines responsables du recrutement des cellules myéloïdes au niveau de la muqueuse.

S layer Proteins (SLPs)

Il a été montré que les SLPs induisent la production de cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- α , IL-12, IL-23 et IL-1 β et un anti-inflammatoire IL-10 (Figure 44). Ryan *et al.* ont montré que les SLPs sont capables d'induire l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoire via le récepteur « *Toll like receptor* » TLR4 (Ryan *et al.*, 2011). Ils ont montré que l'activation des cellules dendritique des souris C3H-HeN par SLPs via le TLR4 déclenche la voie de signalisation NF κ B et induit une réponse mixte du type Th1/Th2 et une réponse du type Th17 caractérisé respectivement par la production de l'interféron γ (IFN γ) et l'IL-17. Les réponses du type Th1 et Th17 sont impliquées dans la clairance du pathogène. De plus, les souris knock-out TLR4 (*tlr4*^{-/-}) ont montré des symptômes plus sévères en comparaison des souris sauvages suggérant un rôle important de la reconnaissance de SLPs par TLR4 dans l'évolution de l'ICD. En outre, Ryan *et al.* ont montré que le TLR4 reconnaît le SLPs intact c'est à dire le complexe LMW/HMW formé par les sous-unités LMW et HMW. Enfin, ils ont montré que les SLPs induisent la maturation des cellules dendritiques caractérisée par la production des IL-12p70, TNF α , IL-23 et IL-6 ce qui a pour conséquence l'augmentation de l'expression du CMH-II, le cluster de différenciation CD40, CD80 et CD86 (Ryan *et al.*, 2011).

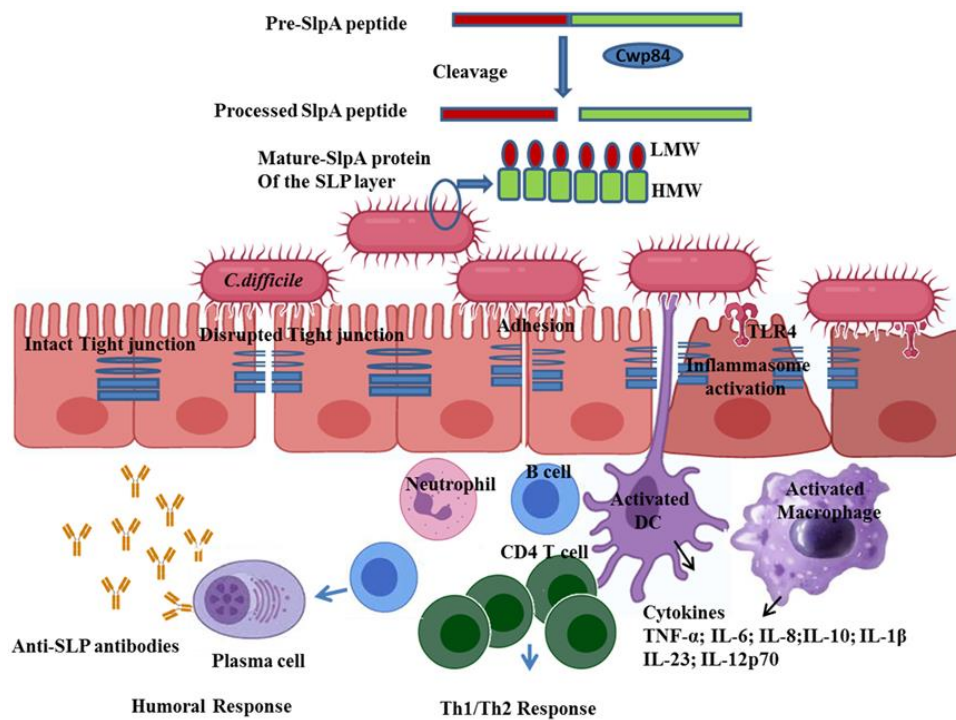


Figure 44 : Immunité innée et adaptative induit par les SLPs.

Cwp84: Cell wall protein 84; SlpA: S-layer protein A; LMW: Low Molecular weight; HMW: High Molecular Weight; IL: Interleukin; TNF: Tumor necrosis factor; TLR4: Toll like receptor. D'après (Chandra *et al.*, 2023).

De plus, il a été montré que les SLPs peuvent également activer la clairance de *C. difficile* par les macrophages via la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires notamment IL-12p40, TNF α , le MCP « monocyte chemotactic and activator factor » et MIP-1 « macrophage inflammatory protein-1 ». Cette réaction est médiée par la voie de signalisation MAP-kinase « Mitogen activated protein kinase » p38 qui active le récepteur TLR4 (Collins *et al.*, 2014).

Ainsi, comme les toxines, les SLPs activent la réponse immunitaire innée de l'hôte via le récepteur TLR4.

Flagelline (FlhC)

Les protéines flagellaires quant à elles, activent les éléments de l'immunité innée via le récepteur TLR5. Des études ont montré que la flagelline de *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* et *E. coli* active le TLR5 au niveau exposé au niveau basolatéral des cellules épithéliales et à la surface des cellules dendritiques. Son activation conduit à l'activation de du facteur NF- κ B par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice My88 et stimule la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) (Hayashi *et al.*, 2001; Tallant *et al.*, 2004).

De même, il a été montré que la flagelline purifiée de *C. difficile* induit l'activation de la MAPK p38 ainsi que de NF- κ B via le TLR5 dans les cellules Caco-2, ceci conduit à la production des

cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-8 et CCL20 (Yoshino *et al.*, 2013). De plus, les auteurs ont montré qu'un prétraitement des cellules par la toxine B favorise une production importante des cytokines par la flagelline, suggérant une synergie entre la toxine B et la flagelline dans l'induction de l'ICD (Yoshino *et al.*, 2013). Batha *et al.* ont montré que l'interaction entre FliC et TLR5 induit principalement l'activation de la voie NF- κ B et que FliC régule positivement l'expression d'IL-8, TNF α , CCL2 et CXCL10 dans les cellules Caco2 (Batah *et al.*, 2016). De plus, ils ont démontré dans un modèle d'infection par *C. difficile* chez la souris l'effet synergique des flagelles et des toxines. Les auteurs ont montré que les souris infectées par une souche toxigène non flagellée avaient un degré d'inflammation des muqueuses plus faible comparativement à l'infection par la souche épidémiologique R20291. De même, les souris infectées par une souche non toxigène mais flagellée avaient des lésions épithéliales légères (Batah *et al.*, 2017). Ces résultats confirment les observations faites *in vitro* par Yoshino *et al.* Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'absence du TLR5 (souris KO *tlr5*^{-/-}) réduit significativement l'inflammation caecale induit par la souche R20291, suggérant le rôle important de l'interaction entre FliC et le TLR5 dans l'exacerbation de l'inflammation (Batah *et al.*, 2017).

L'ensemble des données suggèrent que les toxines induisent la désorganisation du cytosquelette d'actine conduisant à l'ouverture des jonctions serrées des cellules épithéliales (comme décrit dans le chapitre 1), ce qui permet l'interaction entre le flagelle et le TLR5 au niveau basolatéral déclenchant des lésions au niveau des muqueuses intestinales.

4.2. Réponse immunitaire adaptative

4.2.1. La réponse immunitaire adaptative dirigée contre les toxines

Chez la souris, très peu d'études sur la mise en place de la réponse immunitaire adaptative ont été réalisées. Néanmoins, en utilisant le cocktail de Chen (Chen *et al.*, 2008), van Opstal *et al.* ont induit l'infection par *C. difficile* chez des souris jeune âgées de 2 et 18 mois. 24h après l'infection, toutes les souris ont été traitées par la vancomycine pendant 5 jours (van Opstal *et al.*, 2016). Ils ont montré que les souris plus âgées étaient plus susceptibles à l'infection que les souris jeunes. Les auteurs ont comparé les taux d'IgM, IgG et IgA sériques de même que les taux d'IgA caécales contre la toxine TcdA obtenus par ELISA sur la base des densités optiques (DO). Ils ont montré que les taux d'IgM, IgG et IgA sériques à J14 post-infection étaient significativement plus élevés chez les souris jeunes en comparaison des souris plus âgées et plus élevé par rapport aux souris non infectées. Par ailleurs, en comparaison des souris infectées non traitées, les taux d'IgG et IgA sériques sont significativement faibles chez les souris traitées par la vancomycine quel que soit leur âge. Ils n'ont observé aucune différence significative dans le nombre de cellules productrices d'IgG entre les groupes infectés non traités et les groupes infectés traités au niveau de la *lamina propria*. Chez les souris adultes, le

nombre de cellules productrices d'IgG a significativement augmenté dans les tissus intestinaux. En outre, au niveau de la *lamina propria*, le nombre des cellules productrices d'IgA était plus élevé chez les souris jeunes (van Opstal *et al.*, 2016). Ces données suggèreraient que la vancomycine a un effet immunosuppresseur sur la production d'IgG et IgA sériques chez les souris.

Récemment, Leslie *et al.* ont comparé l'infection à *C. difficile* chez des souris C57BL/6 (souris WT) et chez des souris RAG^{-/-} déficientes de cellules B et T (Leslie *et al.*, 2019). Les souris WT et RAG^{-/-} ont éliminé *C. difficile*, suggérant que la clairance digestive de *C. difficile* serait indépendante de la réponse immune adaptative. En outre, les auteurs ont reconstitué la réponse immune adaptative chez les souris RAG^{-/-} en transférant des splénocytes provenant des souris WT colonisées ou non par *C. difficile*. Ils ont mesuré le taux d'IgG total dans les sérums 3 semaines après le transfert. Les souris ayant reçu les splénocytes provenant d'un donneur WT infecté ou non infecté ont un taux d'IgG significativement élevé. Par ailleurs, les auteurs ont pu détecter des IgG anti-TcdA chez les souris receveuses de splénocytes provenant de donneurs WT infectés. La clairance de *C. difficile* dans les groupes était retardée, suggérant que la réponse immune adaptative n'était pas suffisante pour éliminer *C. difficile*. Enfin, l'analyse du microbiote intestinal a montré une diminution de l'abondance du genre *Akkermansia* chez les souris chez qui la réponse immune adaptative a été reconstituée. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le microbiote, indépendamment de la réponse immune adaptative favorise la clairance de *C. difficile* (Leslie *et al.*, 2019).

Dans le cas des infections à *C. difficile*, la plupart des études sur le rôle des toxines TcdA et TcdB dans la réponse immune portent majoritairement sur l'immunisation. Bien que ce chapitre soit sur les études réalisées chez la souris, ces essais d'immunisation sont réalisés dans les modèles de colonisation et d'infection chez le Hamster, voici quelques exemples :

Permpoonpattana *et al.* ont immunisé oralement des hamsters avec des spores recombinantes thermostables de *B. subtilis* exprimant le fragment C-terminal de TcdA (A₂₆₋₃₉) et de TcdB (B₁₅₋₂₄) de *C. difficile*. Les auteurs ont montré que les hamsters immunisés produisaient des IgA sécrétoires capables de neutraliser l'activité cytotoxique des deux toxines (Permpoonpattana *et al.*, 2011). Cependant, une réaction croisée était observée entre les deux anticorps. Ils montrèrent plus tard que les animaux étaient protégés de l'infection par la souche 630 de *C. difficile* lorsqu'ils avaient été préalablement immunisés par les spores recombinantes de *B. subtilis* exprimant le fragment C-terminal de TcdA (A₂₆₋₃₉). Les hamsters ont donc développé des IgA contre le fragment C-terminal de TcdA (A₂₆₋₃₉). En revanche, la vaccination des hamsters par le même fragment C-terminal de TcdA n'avait conféré aucune protection contre l'infection. De plus, ils ont montré que les IgA sécrétoires anti-TcdA₂₆₋₃₉ étaient capables de réduire l'adhésion de *C. difficile* aux cellules HT29-MTX sécrétrices de mucine (Hong *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que le développement d'un vaccin par voie mucoale était susceptible de

conférer une meilleure protection contre l'ICD comparativement aux vaccins basés sur l'immunité humorale qui n'ont pas d'effet sur la colonisation mais que sur la prévention des symptômes d'ICD à travers la neutralisation de l'activité cytotoxique des toxines.

L'immunisation passive des hamsters Syrien par des anticorps monoclonaux (CDA1 et MDX-1388 renommé CDB1) dirigés contre TcdA et TcdB a conduit à la réduction de la mortalité des hamsters et confère une protection accrue à l'infection (Babcock *et al.*, 2006; Lowy *et al.*, 2010). Ces données ont permis de confirmer l'efficacité et l'impact de ces anticorps sur la récurrence des ICD dans des essais randomisés. Ces anticorps CDA1 et CDB1 ont été respectivement renommés actoxumab et bezlotoxumab. Après plusieurs essais randomisés, le bezlotoxumab a été autorisé par la FDA puisqu'il a montré une efficacité et a réduit significativement le risque de récurrence par rapport à l'actoxumab (Wilcox *et al.*, 2017) (voir chapitre 2 – Traitements des ICD).

4.2.2. La réponse immunitaire adaptative dirigée contre les protéines de surface

Même si l'induction d'une réponse immunitaire adaptative par les SLPs, FliC et les autres protéines de surface n'a pas été clairement démontrée, des essais d'immunisation passive et active ont montré que les protéines de surface ont un effet protecteur dans les ICD en empêchant la colonisation par *C. difficile*.

Des essais d'immunisation passive et active chez la souris mais aussi chez le hamster avec les protéines de surface sont regroupés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Les protéines de surface de *C. difficile* utilisées dans les essais d'immunisation passive et active chez l'animal.

D'après (Mizrahi *et al.*, 2014).

Type d'immunisation	Anticorps/antigène	Modèle animal	Voie d'immunisation	Résultat	Référence
Passive	Anticorps anti-Slp	Hamster	Intragastrique	Augmentation de la survie, pas de décès.	(O'Brien <i>et al.</i> , 2005)
Active	Equivalent molaire des sous-unités LMW et HMW de Slp	Hamster	Intrapéritonéale	Pas de différence significative de survie entre le groupe traité et le groupe témoin.	(Ní Eidhin <i>et al.</i> , 2008)
Active	Cwp84 + FliD	Souris	Rectale	Faible colonisation intestinale	(Péchiné <i>et al.</i> , 2007)

Active	Cwp84	Hamster	Rectale	Faible colonisation intestinale (26%) et meilleure survie (33%) par rapport au groupe témoin	(Péchiné <i>et al.</i> , 2011)
Active	Cwp84 (encapsulé dans les billes de pectines)	Hamster	Orale	40% de survie après 10 jours de challenge	(Sandolo <i>et al.</i> , 2011)
Active	GroEL	Souris	Intra-nasale	Faible colonisation intestinale	(Péchiné <i>et al.</i> , 2013)
Active	Extraits de paroi cellulaire	Hamster	Rectale	Diminution significative de la colonisation et de la mortalité	(Péchiné <i>et al.</i> , 2013)
Active	PSII + CRM ₁₉₇	Souris	Sous-cutanée	Immunogénicité du PSII confirmée, pas de challenge.	(Oberli <i>et al.</i> , 2011)
Active	PSI/PSII	Truies en gestation	Non spécifiée	Détection d'IgM spécifique anti-PSII	(Bertolo <i>et al.</i> , 2012)
Active	LTA	Souris Lapin	Intrapéritonéale Sous-cutanée	Immunogénicité du LTA confirmée (IgG), pas de challenge.	(Maldarelli <i>et al.</i> , 2014)
Active	Pili type IV	Souris	Intradermique	Réponses d'anticorps variables, pas de challenge.	(Maldarelli <i>et al.</i> , 2014)
Active	SlpA	Hamster Souris	Intra-rectale	Une diminution de la colonisation de <i>C. difficile</i> chez les souris Protection partielle contre la colonisation chez les hamsters par rapport aux groupes contrôles non vaccinés	(Bruxelle <i>et al.</i> , 2016)

Résumé du chapitre 3

Le microbiote intestinal est une communauté microbienne complexe et stable dont la relation symbiotique avec l'organisme humain est cruciale pour l'homéostasie intestinale et la résistance à la colonisation par des pathogènes intestinaux. La diversité en espèces bactériennes et la résilience de cet écosystème sont des caractéristiques majeures, assurant un fonctionnement optimal. Cependant, toute modification de la structure, de la stabilité ou des activités fonctionnelles du microbiote intestinal peut avoir des effets durables et favoriser les infections intestinales et systémiques. Les antibiotiques notamment ceux à large spectre, sont les facteurs les plus impactant sur la composition et le métabolome du microbiote intestinal, réduisant la résistance à la colonisation et permettant à des microorganismes opportunistes de devenir pathogènes pour l'hôte comme *C. difficile*.

Dans le cas d'une infection à *C. difficile*, des études chez l'Homme et la souris ont montré que l'altération du microbiote par des antibiotiques conduit à la perte des bactéries conférant une résistance à la colonisation par *C. difficile* dont les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae* (Firmicutes), les *Bacteroides*, les *Faecalibacterium* (Bacteroidetes) et les *Bifidobacterium* (Actinobactérie) au profit des *Enterobacteriaceae* (Protéobactérie). La perte de ces bactéries est associée à des altérations dans le métabolome notamment dans la biotransformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. L'abondance des acides biliaires primaires au niveau colique dont ceux dérivés de l'acide cholique notamment le taurocholate, va induire la germination des spores de *C. difficile* en formes végétatives par son interaction aux récepteurs des spores CspC. Ceci va favoriser la colonisation du colon par les formes végétatives de *C. difficile*, la bactérie va se multiplier et produire les toxines.

La production des toxines TcdA et TcdB va induire une réaction immunitaire innée, caractérisée par le recrutement des cellules immunitaires circulantes sur le site de l'infection, la production de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires conduisant à une forte réaction inflammatoire objectivée par des manifestations cliniques. L'analyse de la réponse immunitaire adaptative mise en place par l'hôte pour éliminer le pathogène et ses toxines a montré que les individus asymptomatiques avaient des taux d'anticorps dirigés contre les toxines, de même que les protéines de surface significativement plus élevées par rapport aux patients avec une ICD. Bien que cette réponse soit hétérogène, les études ont montré que le faible taux d'anticorps IgG anti-TcdA de même qu'un faible taux de cellules productrices d'IgA et un faible taux d'IgA mucoales dirigées contre les toxines étaient associés à un risque de récurrence de l'ICD. L'altération du microbiote et de ses fonctions dont la modulation du profil des acides biliaires et la modulation du système immunitaire de l'hôte contre les toxines mais aussi contre les protéines de surface de *C. difficile* sont donc associés à la survenue d'un épisode d'ICD et un risque accru de récurrence de l'infection.

Par conséquent, la réponse de l'hôte face à *C. difficile* est multifactorielle et dépend à la fois de la perturbation du microbiote ou dysbiose, des modifications métaboliques associées à cette dysbiose et à la mise en place d'une réponse immune adaptée à *C. difficile*. Il est donc important de prendre en compte tous ces facteurs pour prédire l'issue de l'infection et dans le développement de nouvelles stratégies de prévention et de traitement de l'infection à *C. difficile*.

TRAVAUX PERSONNELS

Travaux personnels

A. Contexte

Les infections digestives à *C. difficile* surviennent suite à une dysbiose digestive induite par les antibiotiques. Cette altération du microbiote et de ses fonctions associées notamment la biotransformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires va permettre l'implantation des formes végétatives de la bactérie dans le tube digestif et favoriser la production des toxines qui seront responsables des signes cliniques de l'ICD.

Malgré un traitement bien conduit par les antibiotiques dont la vancomycine, le métronidazole ou la fidaxomicine, 20 à 35% des patients sont susceptibles de faire une récurrence, ce qui rend difficile la gestion de ces patients.

D'autre part, plusieurs études ont montré que l'évolution des ICD semble être corrélée à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative de l'hôte dirigée contre les toxines voire contre les protéines de surface de *C. difficile*. Des taux faibles d'IgG sériques et d'IgA muco-sales dirigées contre les toxines seraient associés à la survenue d'une récurrence après un premier épisode. Ainsi, le développement de nouvelles stratégies de traitement ou de prévention basées sur l'immunisation passive ou active ont été proposées. Cependant, la réponse immunitaire adaptative chez l'Homme est très complexe à interpréter du fait d'une variabilité interindividuelle importante et d'une exposition fréquente à la bactérie associée à des cas de colonisation asymptomatique et à des cas d'infection dans les populations étudiées. En effet, des études de séroprévalence dans la population générale ont montré que des anticorps anti-toxines étaient fréquemment détectés. Ceci montre que l'Homme est régulièrement exposé à *C. difficile* et ce très tôt dès l'enfance et tout au long de la vie.

Ainsi, s'il est clair que la réponse immunitaire a un rôle central dans l'évolution des ICD, son implication n'est probablement pas exclusive et les facteurs influençant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative protectrice ne sont pas totalement bien caractérisés.

B. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce projet de thèse est d'étudier les facteurs influençant à la fois la dynamique de la colonisation digestive par *C. difficile* et la réponse immunitaire adaptative en réponse à l'infection dans un modèle souris naïf de toute colonisation.

C. Plan des résultats

La première partie de cette thèse a consisté au développement d'une méthode de production et de purification de toxines recombinantes TcdA et TcdB biologiquement actives chez *C. difficile*. Ce travail préliminaire était essentiel pour disposer de toxines purifiées TcdA et TcdB en grande quantité et en lots homogènes afin de permettre la réalisation des tests de

caractérisation de la réponse immunitaire adaptative (test ELISA quantitatif pondéral et test de séro- neutralisation). La technique de production et de purification, de même que la caractérisation des toxines recombinantes sont décrites dans la publication suivante qui a été soumise et en cours de révision dans *Toxins* et disponible sur Biorxiv.com

**A streamlined method to obtain biologically active TcdA and TcdB toxins from
*Clostridioides difficile***

(Article soumis dans *Toxins*, en révision)

La deuxième partie de mes travaux a consisté en l'utilisation d'un modèle expérimental de colonisation et d'infection par *C. difficile* chez la souris préalablement exposée à un cocktail d'antibiotiques inducteurs de dysbiose digestive, adapté et validé par notre équipe à partir du modèle décrit par Chen (Chen *et al.*, 2008). L'utilisation de ce modèle est basée sur le fait que la souris constitue un hôte naïf de tout antécédent de *C. difficile*. Ce modèle permet de reproduire la colonisation digestive puis une infection spontanément résolutive sans être fatale pour les animaux, permettant ainsi un suivi longitudinal après l'infection. La dynamique de la colonisation digestive et de la primo-infection n'est donc pas influencée par une éventuelle réponse immunitaire mémoire suite à un antécédent d'ICD comme souvent observée chez l'Homme.

Grâce à ce modèle préalablement validé par l'équipe (Annexe 1), nous avons évalué différentes conditions de traitements antibiotiques susceptibles d'influencer la cinétique de mise en place d'une réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre les toxines TcdA et TcdB de *C. difficile*. L'analyse de la réponse immunitaire adaptative produite en réponse à l'infection a été réalisée par la méthode ELISA quantitative pondérale que nous avons mis au point. Le suivi de la colonisation digestive par *C. difficile* de même que la modulation de la réponse immunitaire adaptative font l'objet d'un article en préparation, présenté dans le chapitre II – partie A.

**Impact of antibiotics on the dynamics of digestive colonization by *Clostridioides difficile*
and on the adaptive immune response**

(Article en préparation)

Nous avons également évalué l'impact de ces antibiotiques sur la modulation du microbiote intestinal au cours de l'infection. Ces résultats sont en cours de consolidation et seront présentés dans le chapitre II – partie B.

Impact de différents antibiotiques sur la modulation du microbiote digestif en réponse à l'infection par *Clostridioides difficile*

(Résultats non publiés)

Enfin, un objectif secondaire de cette thèse est le développement d'une méthode d'extraction et de séparation des différents acides biliaires primaires et secondaires pour permettre le suivi de leur profil au cours du processus de dysbiose digestive induite dans notre modèle d'infection à *C. difficile* chez la souris. Pour cela, nous avons collaboré avec la plateforme de dosage du Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph. Les résultats préliminaires sont présentés dans le chapitre III.

Développement d'une méthode de dosage des acides biliaires dans les échantillons complexes

(Résultats non publiés)

RESULTATS

Résultats

Chapitre I : Production et purification des toxines recombinantes de *C. difficile*

Présentation de l'article

Les toxines TcdA et TcdB produites par *Clostridioides difficile* ont pour action de provoquer une altération du cytosquelette et de conduire au recrutement de nombreux polynucléaires neutrophiles favorisant ainsi le processus inflammatoire et conduisant aux manifestations cliniques d'ICD. L'étude des toxines est donc une étape cruciale dans le suivi de la virulence de ce pathogène. Actuellement, le processus de purification des toxines natives est soit laborieux chez *C. difficile*, soit réalisé chez des hôtes hétérologues (ex : *Bacillus megaterium*). Nous proposons ainsi une nouvelle méthode permettant de produire rapidement des toxines purifiées et fonctionnelles à partir d'une souche de *C. difficile*.

La construction des souches permettant la production des toxines recombinantes TcdA (rTcdA) et TcdB (rTcdB) a été réalisée en deux étapes. La première consiste à ajouter une séquence codant pour l'His-tag à l'extrémité 3' des gènes *tcdA* et *tcdB* de la souche 630 Δ *erm* de *C. difficile* par méthode d'échange allélique. Ces souches ensuite ont été utilisées pour générer deux nouvelles souches en remplaçant par le même procédé le promoteur natif des toxines par le promoteur P_{tet} inducible par l'anhydro-tétracycline (ATc). En utilisant ces souches, les toxines recombinantes rTcdA et rTcdB ont été produites après induction par l'ATc et purifiées en conditions natives à l'aide d'une résine nickel et une élution à base d'imidazole. De manière reproductible, après purification, nous obtenons des concentrations autour de 0,28 mg/L et 0,1 mg/L, respectivement pour rTcdA et rTcdB.

Plusieurs tests de fonctionnalité ont été réalisés avec les toxines recombinantes purifiées et comparés à ceux réalisés avec les toxines natives afin de confirmer que ces toxines purifiées ont gardé leur activité biologique :

- En faisant un test de cytotoxicité et neutralisation sur une monocouche de cellules Vero, nous avons observé une activité cytotoxique conservée dose-dépendante pour les deux toxines recombinantes qui sont neutralisées par les anticorps présents dans les sérums de patients testés ICD. En outre, rTcdA et rTcdB induisent la réorganisation du cytosquelette d'actine comme les toxines natives après marquage de l'actine par la rhodamine phalloïdine.
- Nous avons confirmé que ces toxines recombinantes pouvaient être utilisées comme antigène pour l'ELISA avec une forte corrélation des résultats quantitatifs obtenus objectivée en testant des sérums humains de patients convalescents d'une ICD.

Au final, nous avons généré des souches recombinantes de *C. difficile* capables de produire à la demande des toxines recombinantes rTcdA et rTcdB de *C. difficile*. Nous avons également montré que les toxines recombinantes obtenues ont des activités biologiques similaires à celles des toxines natives. De plus, l'utilisation de la souche 630 Δ *erm* comme souche hôte permet une certaine flexibilité dans le génie génétique, par exemple en permettant la modification potentielle de la toxine produite. Ces toxines purifiées et ces souches génétiquement modifiées seront des outils précieux et utiles pour mieux comprendre la physiopathologie des infections à *C. difficile*.

A streamlined method to obtain biologically active TcdA and TcdB toxins from *Clostridioides difficile*

Afi Akofa Diane Sapa^{1†}, Anaïs Brosse^{1*†}, Héloïse Coullon¹, Gauthier Pean de Ponfilly^{1,2}, Thomas Candela^{1&}, Alban Le Monnier^{1,2&}

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France.

² Service de Microbiologie clinique GH Paris Saint-Joseph, Paris, France

[†] AADS and AB contributed equally to this work and share first authorship

[&] TC and ALM also contributed equally to this work and share last authorship

* Corresponding author: e-mail: anaïs.brosse@universite-paris-saclay.fr

Abstract: The major virulence factors of *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) are enterotoxin A (TcdA) and cytotoxin B (TcdB). The study of toxins is a crucial step in exploring the virulence of this pathogen. Currently, the toxin purification process is either laborious and time-consuming in *C. difficile* or performed in heterologous hosts. Therefore, we propose a streamlined method to obtain functional toxins in *C. difficile*. Two *C. difficile* strains were generated each harboring a sequence encoding a His-tag at the 3' end of *C. difficile* 630 Δ erm *tcdA* or *tcdB* genes. Each toxin gene is expressed using the P_{tet} promoter inducible by anhydro-tetracycline. The obtained purification yields were 0.28 mg and 0.1 mg per liter for rTcdA and rTcdB, respectively. In this study, we successfully developed a simple routine method that allows the production and purification of biologically rTcdA and rTcdB active toxins with similar activities compared to native toxins.

Keywords: *Clostridioides difficile*, toxin, recombinant protein, cytotoxic activity, TcdA, TcdB

Key Contribution: The study of toxins is a crucial step in exploring the virulence of *C. difficile*. This study reports a new method to rapidly obtain functional recombinant toxins in *C. difficile*.

1. Introduction

Clostridium difficile (*C. difficile*) is a Gram-positive, anaerobic, spore-forming, toxin-producing bacillus that was renamed *Clostridioides difficile* in 2016 [1]. *C. difficile* was initially identified as part of the flora of healthy infants in 1935 [2]. It was subsequently described as a causative agent of digestive tract infections often involved in antibiotic-associated diarrhea ranging from mild to severe and life-threatening complications such as pseudomembranous colitis. *C. difficile* infections (CDI) are associated with high recurrence rates, reaching up to 30 % of cases [3–5]. CDI have been recognized as a leading cause of healthcare-associated infections and more generally, a substantial threat to public health [6–8]. The main risk factor for developing CDI is antibiotic therapy [9] which can disrupt the gut microbiota. In this context of dysbiosis, spores of *C. difficile* will germinate into vegetative forms which will then colonize the gut microbiota, multiply, and produce virulence factors, in particular enterotoxin A (TcdA) and cytotoxin B (TcdB) that lead to the development of symptoms. TcdA and TcdB are encoded by the *tcdA* and *tcdB* genes, localized in the 19.6kb pathogenesis locus (PaLoc), along with three additional genes that allow regulation and release of the toxins (*tcdR*, *tcdC*, and *tcdE*, [10]). TcdA and TcdB are expressed when bacterial cells enter the stationary phase, likely caused by the limitation of nutrients [11]. TcdA and TcdB belong to the family of Large Clostridia Toxin (LCTs) due to their high molecular weight (308 and 270 kDa respectively). The LCTs can induce profound changes in cell morphology [12]. These toxins are composed of four functional

Citation: To be added by editorial staff during production.

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

domains; the N-terminal glucosyl-transferase region, the auto-processing cysteine protease domain, a membrane translocation region (CROPS), and a C-terminal Receptor-Binding Domain region. After binding to their receptors on the cell surface, endocytosis is initiated and toxins are internalized into endosomes. Subsequent acidification of the endosomes induces a conformational change of the delivery domain, resulting in pore formation and translocation of a catalytic glucosyltransferase domain across the endosomal membrane. The toxins subsequently undergo autocleavage which releases the N-terminal glucosyltransferase region into the cytoplasm [13]. The glucosyltransferase activity domain targets and inactivates Rho GTPases, including Rac1 and Cdc42 at Thr35 as well as RhoA at Thr37. Inactivation of Rho GTPases leads to actin-depolymerization, which results in cell rounding, disaggregation of the actin cytoskeleton, loss of intestinal epithelial barrier function and cell death. In addition to their direct cytotoxic effects, TcdA and TcdB elicit a pro-inflammatory response contributing to tissue damage and leading to severe complications such as pseudomembranous colitis [14,15]. In recent years, studies have provided further insight into the structure of TcdA and TcdB across *C. difficile* strains, leading to the identification of distinct subtypes of toxins [16]. Of note, clade 2 hypervirulent *C. difficile* strains have been linked to the expression of toxin subtypes TcdB2 and TcdB4. Importantly, subtypes of TcdB toxins have also been linked to the recognition of distinct receptors within the host [17,18]. Taken together, these recent results highlight the need for adequate tools for accurate toxin studies.

Having biologically functional purified toxins is an important tool to understand these toxins' activities in the modulation of the pathogenesis of CDI, the host immune response and more importantly for the development of CDI treatments. In addition, clinical research relies on *C. difficile* toxins to quantify anti-TcdA or TcdB antibodies by ELISA or for neutralizing antibody tests. The native toxins are usually purified from toxigenic *C. difficile* VPI 10463 culture supernatant [19–21] but the purification process is fastidious, time-consuming, and requires multiple steps. In this study, we aimed to develop a simplified method for the purification process of biologically active native *C. difficile* TcdA and TcdB by directly using *C. difficile* toxigenic strain 630 Δ erm as the host.

2. Results

2.1. Selection of *C. difficile* strain

Since previous studies relied on the VPI 10463 strain for the purification of TcdA and TcdB, we first sought to determine whether the native toxins from the 630 Δ erm strain were structurally comparable to the toxins from the VPI 10463 strain. We performed a protein sequence comparison for TcdA and TcdB across 39 *C. difficile* strains and generated phylogenetic trees of each protein list (Figure 1, panels A and B). Each protein entry was subsequently annotated based on their described toxin subtypes [16]. Analysis of these trees showed a distribution of TcdA proteins in tree distinct clusters, which appeared consistent with the toxin subtypes (Figure 1a; TcdA1, TcdA2, TcdA3). Similarly, TcdB proteins appeared in three distinct clusters, consistent with three TcdB subtypes (Figure 1b; TcdB1, TcdB2, TcdB5). In these trees, the TcdA and TcdB proteins of the 630 Δ erm and VPI 10463 strains were found in the same clusters, suggesting that they are of the same toxin subtype (TcdA1 and TcdB1 respectively). In addition, percent identity matrixes showed identity scores of 99.82% and 100% for TcdA and TcdB respectively (File S1). Of note, the full-length alignment of TcdA_{630 Δ erm} and TcdA_{VPI 10463} showed only two differing residues between both proteins at position 2421-2422, which corresponds to the CROPS domain associated with membrane translocation (Figure 1c and File S1). Taken together, these results demonstrate that the toxins of the 630 Δ erm are nearly identical to those of the VPI 10463 strain, confirming the potential use of the 630 Δ erm as a replacement of the VPI 10463 strain for toxin production.

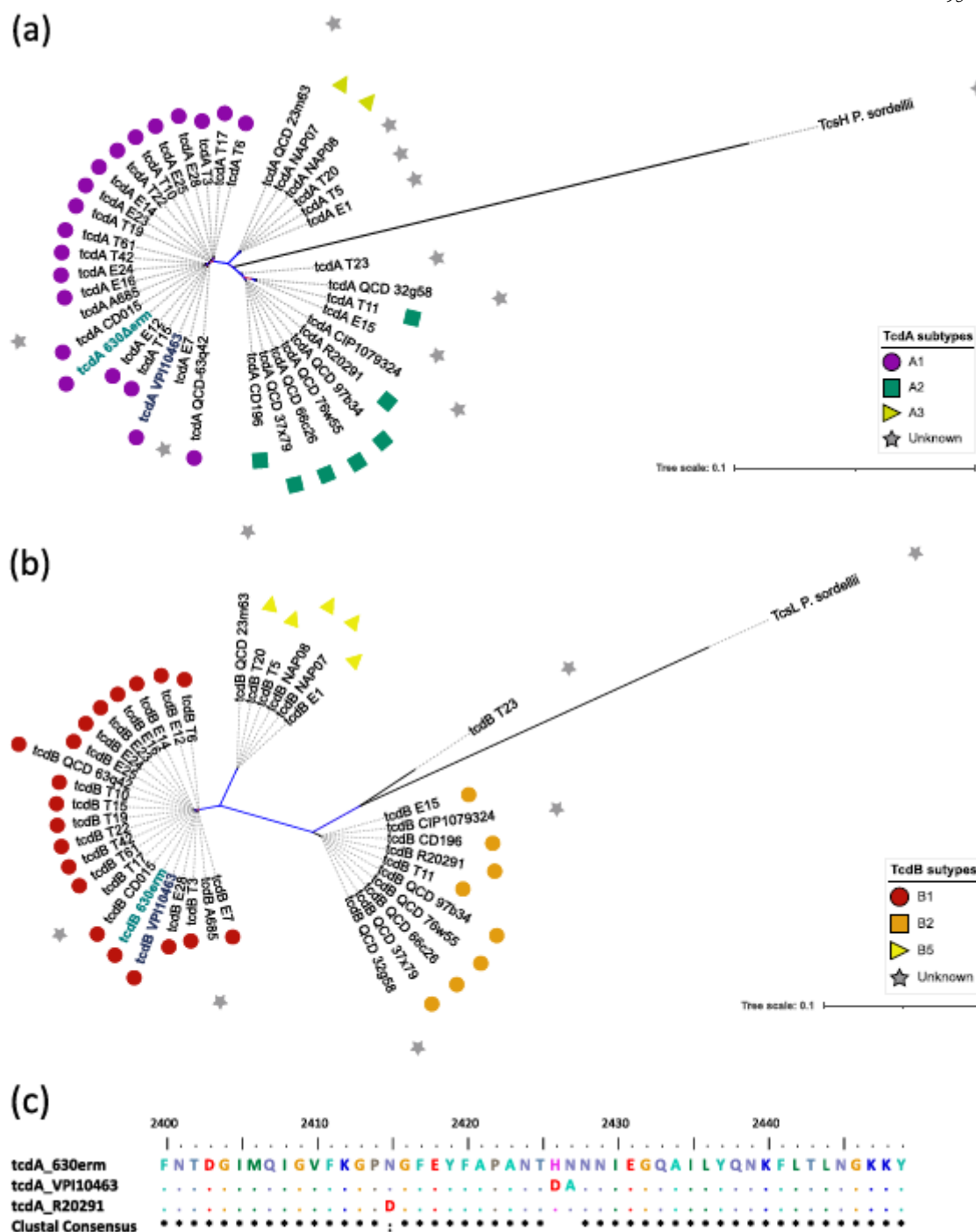


Figure 1. Toxins of the 630 Δ erm and VPI strains are found in shared clusters. Unrooted phylogenetic trees of (a) TcdA and (b) TcdB proteins obtained from 39 *C. difficile* genomes, with bootstrap values represented as branch colors ranging from 0 in red to 1 in blue. Symbols represent the toxin subgroups for each protein in the trees: TcdA1 = purple circle / TcdA2 = green square / TcdA3 = yellow triangle / TcdB1 = red circle / TcdB2 = orange square / TcdB5 = yellow triangle. In both graphs, gray stars represent proteins for which the toxin subtype is either unknown (*C. difficile* proteins) or not applicable (TcsH and TcsL). Reference sequences from the *C. difficile* 630 Δ erm and VPI 10463 strains are indicated in bold letters. In addition, each tree contains the closest Large Clostridial Toxin for the respective toxin (TcsH from *P. sordellii* for TcdA / TcsL from *P. sordellii* for TcdB). (c) Multiple sequence alignment of positions 2400 to 2450 of TcdA proteins using *C. difficile* 630 Δ erm, VPI 10463 and R20291 strains, with the resulting clustal consensus sequence. Identical amino acids are represented as dots.

2.2. Expression and purification of recombinant toxins

We then constructed two pseudo-suicide plasmids pADS1 and pADS2. These plasmids were used to transfer a sequence encoding a His-tag at the 3' end of *tcdA* and *tcdB* genes by conjugation and generate *C. difficile* strains AD1 and AD2 (Figure S1), respectively for the production of recombinant toxins rTcdA and rTcdB. The resulting AD1 (*tcdA*-His) and AD2 (*tcdB*-His) strains were grown in TY medium during 75 to 92 h to induce *tcdA* and *tcdB* expression under physiological conditions. rTcdA and rTcdB were then purified by Ni-NTA chromatography affinity under denaturing conditions. The rTcdA and rTcdB proteins were not found in the raw protein fraction, the flowthrough, or the eluted fractions (Figure S2). These results suggest that we could not purify rTcdA and rTcdB using these culture conditions probably due to a lack of *tcdA* and *tcdB* expression.

To control and optimize the production yield of *C. difficile* toxins, we replaced *C. difficile* *tcdA* and *tcdB* gene promoters with the ATc inducible P_{tet} promoter in AD1 and AD2 respectively. This gave rise to *C. difficile* strains AD3 and AD4 containing the promoter P_{tet} in front of the *tcdA* and *tcdB* open reading frame and a sequence encoding a His-tag in the 3' end of each gene (Figure S1). The recombinant AD3 (P_{tet} -*tcdA*-His) and AD4 (P_{tet} -*tcdB*-His) strains were used to purify rTcdA and rTcdB respectively after 4h induction by ATc using Ni-NTA affinity chromatography under native conditions. SDS-PAGE gels showed an expected band of about 308 kDa (Figure 2a, lane 4) corresponding to rTcdA and an expected band of about 270 kDa (Figure 2b, lane 4) corresponding to rTcdB. rTcdA and rTcdB purification yields are 0.28 mg and 0.1 mg per liter of initial culture, respectively. Our new approach allows efficient and straightforward purification of the TcdA and TcdB toxins.

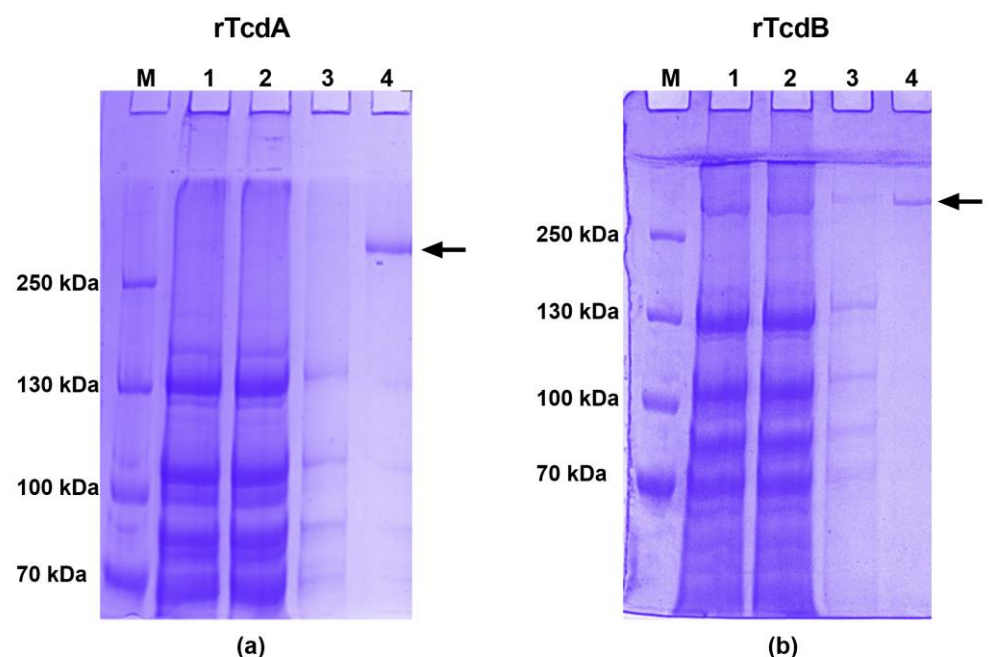


Figure 2. Purification of recombinant toxins by Ni-NTA affinity chromatography under native conditions. Toxins were visualized by Coomassie staining for (a) recombinant toxin A (rTcdA) and (b) recombinant toxin B (rTcdB) M: markers / 1: total bacterial lysate / 2: flow through / 3: 10 mM imidazole wash / 4: eluates after PD10. The SDS-PAGE gels shown are representative of at least 10 purifications.

2.3. Recombinant purified toxins possess similar biological activity compared to native toxins

Functional activities of rTcdA and rTcdB were tested on Vero cells. First, we compared the cytotoxicity activity of the recombinant toxins with native toxins. After 18 hours

of incubation, cells incubated with either native toxin TcdA, TcdB, purified rTcdA or purified rTcdB showed cell rounding at $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figures 3b, 4b, 3g and 4g respectively), compared to the healthy confluent morphology observed for the negative controls (cells incubated without toxins – Figures 3a, 3f, 4a and 4f). Toxin activity decreased due to decreasing toxins concentrations, with no detectable cell rounding at 32 ng.mL^{-1} (Figures 3e, 3j, 4e, and 4j). These results suggest that rTcdA and rTcdB have similar cytotoxicity activity compared to native toxins on Vero cells and that this effect is dose-dependent.

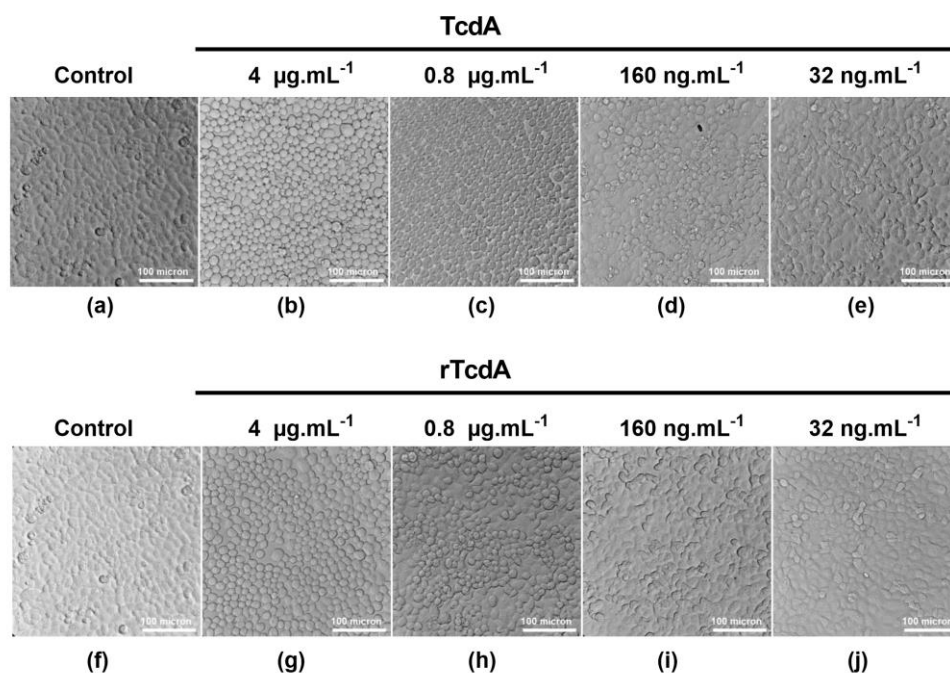


Figure 3. Cytotoxicity assay on Vero cells, TcdA versus rTcdA. Cells seeded in 96 wells plate were incubated in the absence of toxin (a and f) or with decreasing concentrations ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 160 ng.mL^{-1} , and 32 ng.mL^{-1}) of either native toxin TcdA (b, c, d, and e) or recombinant toxins rTcdA (g, h, i, and j). Cells were incubated for 18 hours and morphological changes were observed under phase contrast microscopy.

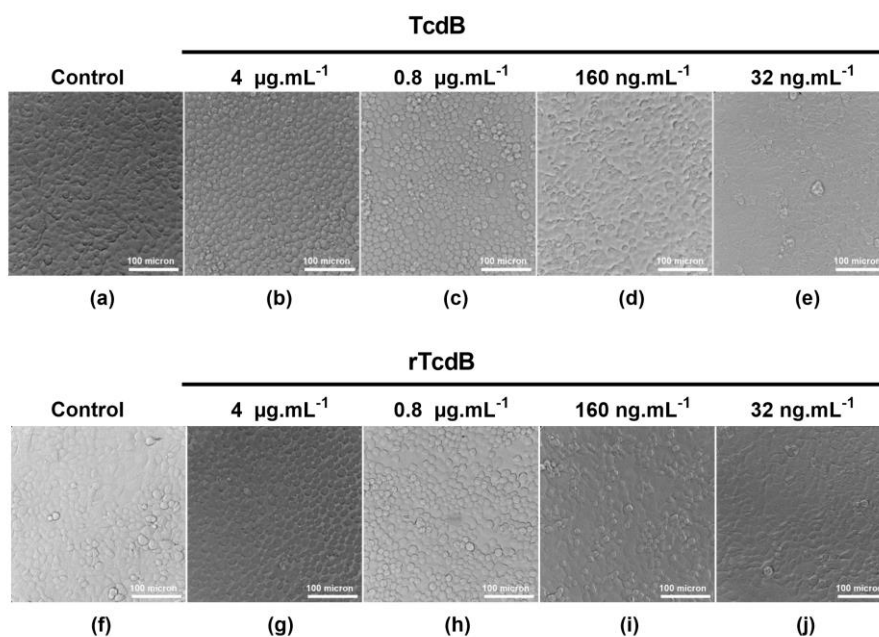


Figure 4. Cytotoxicity assay on Vero cells, TcdB versus rTcdB. Cells seeded in 96 wells plate were incubated in the absence of toxin (a and f) or with decreasing concentrations ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 160 ng.mL^{-1} , and 32 ng.mL^{-1}) of either native toxin TcdB (b, c, d, and e) or recombinant toxins

rTcdB (g, h, i, and j). Cells were incubated for 18 hours and morphological changes were observed under phase contrast microscopy.

We then explored if purified rTcdA and rTcdB could also induce actin cytoskeleton remodeling, as described for the native toxins. Incubation of cells with either native toxins or purified recombinant toxins lead to a decrease in cell size compared to the negative control (Figure 5a and Figure S3). Furthermore, the decrease is similar between native and purified recombinant toxins. We then looked closely at the morphological changes of the cells (Figure 5b), and we found that the actin cytoskeleton was completely disrupted with both native (Figure 5c and 5e) and recombinant toxins (Figure 5d and 5f). Taken together, these results demonstrate that the purified recombinant toxins are as active as the native toxins.

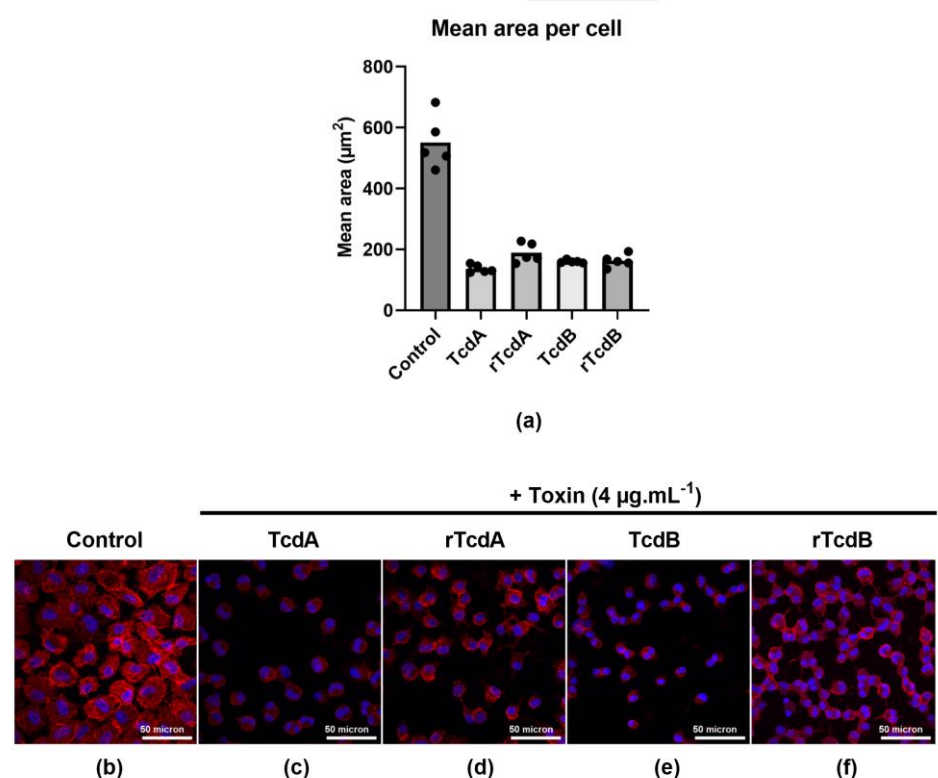


Figure 5. Disruption of the tight junction on Vero cells. Cells in 24 wells plate were in the absence of toxin (control) or in the presence of $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of either native or recombinant toxins A and B. Cells were incubated for 18 hours, fixed, and stained with Rhodamine Phalloidin (actin staining in red) and DAPI (nuclei staining in blue) then observed under confocal microscopy with 20x objective to quantify the effect of toxins on the cells. (a) Five random fields were taken to perform an analysis with FIJI imaging software. (b-f) Cell morphology changes were observed with 63x objective, for (b) the control, (c and e) native toxins and (d and f) purified recombinant toxins at $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.4. Recombinant toxins can be used as substitutes for native toxins in clinical CDI investigational studies

The native TcdA and TcdB toxins are currently used in several clinical research assays, including indirect ELISA assays and neutralization antibody assays. We first wanted to evaluate the use of purified recombinant toxins as coating antigens in quantitative indirect ELISA to measure anti-TcdA and TcdB antibody titers. Thus, we compared the concentration of IgG determined for several sera from CDI recovered patients using assays done with native toxins and assays done with purified recombinant toxins. We obtained

equivalent concentrations of IgG in both native and recombinant toxins assays, with a strong correlation as determined by Pearson correlation coefficient (Figure 6a and 6b).

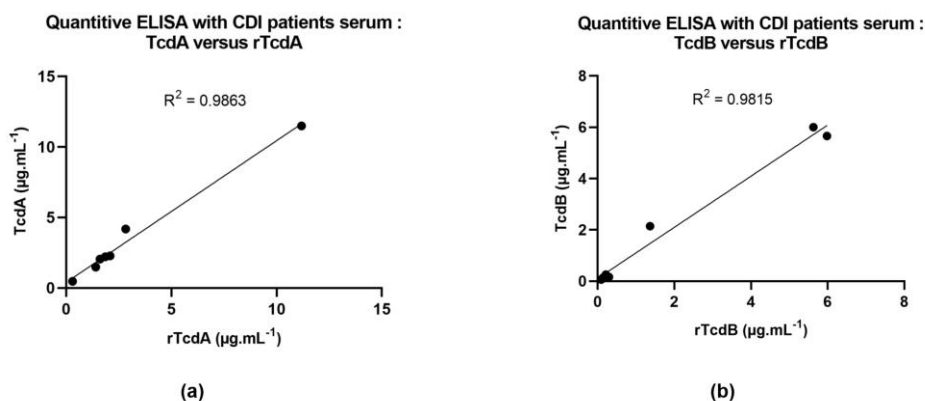


Figure 6. Comparison of native or recombinant toxins by quantitative ELISA. We determined the IgG concentration in 7 samples of serum from CDI patients by quantitative ELISA, for (a) TcdA or (b) TcdB. Graphs are plotted with the IgG titers obtained with recombinant or native toxins in the x and y-axis respectively. The R² represents the Pearson correlation coefficient.

Finally, we performed a neutralization antibody assay comparing both sets of toxins. In these assays, we showed that incubation of the toxins with serum samples from CDI recovered patients leads to a reduction in the cytotoxic effect of both rTcdA (Figure 7e) and rTcdB (Figure 7h). These results indicate that the effect of purified recombinant toxins can be neutralized by serum antibodies from a CDI recovered patient, confirming that the C-terminal His-tag does not hinder detection of the protein itself. Taken together, these results suggest that the purified recombinant toxins are adequate substitutes for native toxins and their use in clinical research assays.

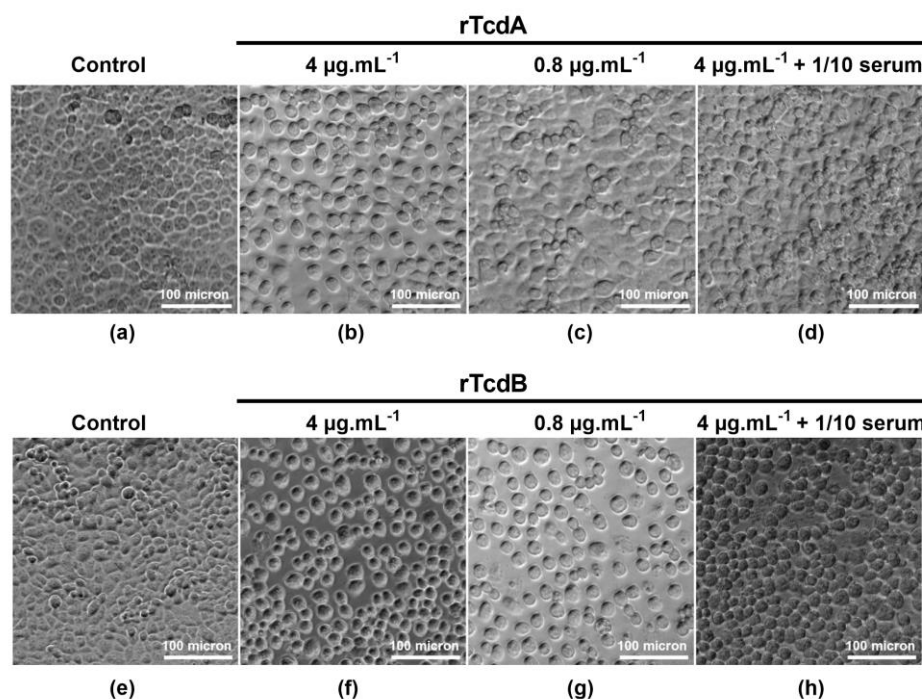


Figure 7. Neutralization assay on Vero cells. Cells in 96 wells plate were incubated (a and e) in the absence or with (b, c, and d) rTcdA and (f, g, and h) rTcdB at 4 µg.mL⁻¹, 0.8 µg.mL⁻¹ and 75 µl of 4 µg.mL⁻¹ of toxins preincubated with 75 µl of 1/10 dilution of CDI patient serum. Cells were incubated for 18 hours and morphological changes were observed under phase contrast microscopy.

3. Discussion

C. difficile pathogenicity is linked to the production of two major virulence factors, the toxins A (TcdA) and B (TcdB). Multiple studies have increased our knowledge about the regulation, structures, and functions of *C. difficile* toxins. Recently, toxin subtypes have been identified and linked to various *C. difficile* strain clades, as well as recognition of different host receptors [16–18]. To provide new insights about their involvement in the pathophysiology of *C. difficile* infections, we need to have readily available biologically active toxins. Purified TcdA and TcdB have been useful research tools to access the host immune response against CDI by detecting the antibodies titers by ELISA assays [39–41]. TcdA and TcdB have also been used in immunization assay for the production of anti-TcdA and TcdB antibodies required in immunoblotting. Their active form have been used to study the cellular effects of these toxins in cytotoxicity assay [42], moreover in neutralization assay to study the neutralizing potential of the antibodies produced by CDI patients [31,32].

Previous purification methods of TcdA and TcdB in their native forms share similarities with those used for the purification protocols of toxins produced by other *Clostridium* spp. (*C. septicum*, *C. sordellii*, *C. perfringens*) [43–47]. In contrast with our new purification method, the purification process of native toxins is laborious and time-consuming as it requires multiple steps such as four to five days of growth in medium, ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography followed by gel filtration chromatography.

To simplify this process and obtain biologically active toxins, generating recombinant toxins in a heterologous host seemed to be a viable strategy to adopt. Over the years, in the case of *C. difficile* toxins, multiple attempts have been made to purify TcdA and TcdB in *E. coli* strains, an expression system mostly used to produce recombinant proteins. Because of the large size of the *tcdA* and *tcdB* genes, expression of the entire toxin genes in *E. coli* is time-consuming and traditionally consisted in the reconstruction of cloned fragments [48]. Moreover, purification of the full-length toxin in *E. coli* was only shown for TcdA. Other studies reported the purification of fragments of TcdA or TcdB [49]. The folding of such a toxin is therefore not guaranteed. Purifying toxins from the original host is more adequate to study their structure or potential post-translational modifications.

Besides *E. coli*, Burger *et al.* and Yang *et al.* have successfully expressed and purified biological active recombinant TcdA and TcdB using *Bacillus megaterium* [50,51]. We asked for the recombinant *B. megaterium* strains expressing TcdA and TcdB. However, we could not obtain adequate titers of recombinant toxins due to difficulties in the lysis process. Finally, there are other alternatives to obtain these toxins such as commercial toxins but they are expensive and do not guarantee the biological activity. Because of these limitations and our need to use active toxins in our studies, we aimed to develop a method that simplifies the purification process of *C. difficile* TcdA and TcdB by directly using *C. difficile* strain 630 Δ *erm* as the host.

The advantage of our method is, after optimizing the production and purification process, we were able to shorten toxin expression time by 10 (a half day instead of five days) and simplify the purification process compared to native toxins production. Furthermore, using the 630 Δ *erm* as a host strain allows for flexibility in genetic engineering. For example, it allows the potential modification of the toxin produced, for instance to purify truncated or mutated versions of either toxin. Further work can also be done to optimize purification yields, for example by adjusting the growing media.

Using human sera from CDI recovered patients, we confirmed that these recombinant toxins could be used as antigens for ELISA for our studies based on a high correlation between the quantitative results of anti-TcdA and anti-TcdB antibodies obtained with recombinant and native toxins. In addition, our purified recombinant toxins conserved their biological activities compared to native toxins. Indeed, using cell cytotoxicity assay on Vero cells, we observed a dose-dependent cytopathic activity for both recombinant toxins

and this activity can be neutralized using antibodies from a CDI recovered patient. Moreover, both recombinant toxins alter the structure of intestinal epithelia by modifying the actin cytoskeleton and opening tight junctions as already described [14,52,53].

In this study, we aimed to develop a method that simplifies the purification process of *C. difficile* TcdA and TcdB by directly using *C. difficile* strain 630 Δ erm as the host. This allows easier genetic engineering of the strains for the optimization of the purification process, enabling other researchers to refine the methods for their own research needs. This is particularly crucial as new data emerges on the subtypes of TcdA and TcdB toxins and their respective roles. Indeed, it now appears that we can no longer consider TcdA and TcdB as two individual toxins homogenous across strains, but rather as groups of toxin subtypes with variations of structures and biological targets. For instance, TcdB2 and TcdB4 toxin subtypes have been shown to be recognized by the TFPI receptor, while TcdB1/TcdB3/TcdB5 appear to recognize Wnt receptor Frizzled proteins (FZD). Since toxins from the 630 Δ erm or VPI 10463 strains appear in distinct clusters from toxins of the R20291 strain (Subtypes A1 / A2 and B1 / B2 respectively), toxins purified from the 630 Δ erm/VPI 10463 strains would not be adequate proxies for the study of toxins from R20291 strain or any strain possessing TcdB2 toxins. As such, researchers interested in deciphering the roles of TcdA and TcdB will require tools that allows for the construction, production and characterization of specific toxin subtypes. To the best of our knowledge, such specificity in toxin sources and production was unattainable until now. Through this work, we successfully generated recombinant strains able to produce recombinant toxins A and B of *C. difficile* on demand, and showed that the recombinant toxins obtained have similar biological activities compared to native toxins. Simple genetic engineering is therefore all that is needed for the production of toxins in the 630 Δ erm strain background, from the production of TcdA and/or TcdB from any *C. difficile* strain, to the construction truncated or chimeric toxins. We believe that these purified toxins and genetically engineered strains will be valuable and helpful tools used to better understand the pathogenesis of *C. difficile* infections.

4. Materials and methods

4.1. Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

Bacterial strains, primers, and plasmids used in this study are detailed in Tables S1, S2 and S3. *E. coli* strains were grown aerobically at 37°C in Luria Bertani (LB) medium (Becton, Dickinson) supplemented with Ampicillin (Amp; 100 μ g.mL⁻¹) or Chloramphenicol (Cm; 25 μ g.mL⁻¹) as appropriate. *C. difficile* strains were grown at 37 °C in an anaerobic chamber using Brain Heart Infusion (BHI) medium (Becton, Dickinson) or tryptone-yeast medium (TY; 3 % Bacto tryptose (Becton, Dickinson), 2 % Bacto yeast extract (Becton, Dickinson), and 0.1 % thioglycolate, adjusted to pH 7.4) supplemented as appropriate with Thiamphenicol (Tm; 15 μ g.mL⁻¹), Aztreonam (Az; 16 μ g.mL⁻¹) or nonantibiotic analog Anhydro - tetracycline (ATc; 0.05 μ g.mL⁻¹, 0.1 μ g.mL⁻¹, 0.25 μ g.mL⁻¹, 0.5 μ g.mL⁻¹).

4.2. Constructs and cloning in *C. difficile* 630 Δ erm strain

Plasmid extraction (Omega, VWR), endonuclease digestion (New England Biolabs), ligation (New England Biolabs), and agarose gel electrophoresis were carried out as described by Maniatis *et al.* [22]. The Phusion polymerase (New England Biolabs) used for Polymerase Chain Reaction (PCR) and Golden gate cloning kit (New England Biolabs) were carried out according to the manufacturer's instructions. All inserts cloned in the constructed plasmids were sequenced (Eurofins Genomics).

In order to have a plasmid suitable for the Golden gate cloning strategy, the pTC130 was constructed. First, the spectinomycin cassette from the pAT28 plasmid [23] was amplified using primers 2836/2837 and cloned into the pBlunt2 plasmid (Invitrogen), giving rise to pTC129. The 1.09 kb BamHI/EcoRV fragment extracted from pTC129 was ligated into pMSR [24] digested with BamHI/PvuII, giving rise to pTC130.

Plasmids pADS1 and pADS2 were constructed for the genomic insertion of 6xHis-tags before the STOP codons of *tcdA* and *tcdB* respectively, using the following strategy. Two DNA fragments flanking the STOP codon of *tcdA* were obtained by PCR using *C. difficile* 630 Δ *erm* genomic DNA and primers 2854/2851 and 2852/2853. These DNA fragments were cloned into pTC130 by the golden gate method [25] giving rise to pADS1. Similarly, two PCR DNA fragments flanking the STOP codon of *tcdB* were obtained using 2858/2859 and 2860/2861 primer pairs on *C. difficile* 630 Δ *erm* genomic DNA and cloned into pTC130 by the golden gate method, giving rise to pADS2. Plasmids pADS1 and pADS2 were confirmed by enzymatic restriction as well as sequencing of the inserts. pADS1 and pADS2 recombinant pseudo suicide plasmids were transferred by heterogramic conjugation from conjugative *E. coli* strain HB101 (pRK24) to *C. difficile* 630 Δ *erm*. The recombinant strains AD1 and AD2 were selected as described by Peltier *et al.* [24]. Recombinant mutants were confirmed by PCR and sequencing of the targeted genomic region.

The same strategy was used to build the pADS3 and pADS4 plasmids to replace the *tcdA* and *tcdB* promoters with a P_{tet} promoter. Homologous fragments upstream (CO1) and downstream (CO2) of the *tcdA* promoter were amplified from *C. difficile* 630 Δ *erm* extracted genomic DNA using primers 3046/3047 and 3050/3051. The P_{tet} promoter from the pRPF185 plasmid [26] was amplified using primers 3048/3049. These three fragments were cloned into pJV7 [27] by the golden gate method, giving rise to pADS3. Similarly, PCR DNA fragments CO1 and CO2 flanking the promoter of *tcdB*, obtained using primers 3052/3053 and 3056/3057 on *C. difficile* 630 Δ *erm* genomic DNA, as well as the P_{tet} promoter, amplified from the pRPF185 plasmid using primers 3054/3055, were cloned into pJV7 by the golden gate method, giving rise to pADS4. After confirmation by enzymatic restriction and sequencing, the pADS3 and pADS4 recombinant pseudo-suicide plasmids were transferred by heterogramic conjugation from conjugative *E. coli* strain HB101 (pRK24) to *C. difficile* strains AD1 (*tcdA*-His) and AD2 (*tcdB*-His). Selection of the recombinant strains AD3 (P_{tet}-*tcdA*-His) and AD4 (P_{tet}-*tcdB*-His) was performed as described by Peltier *et al.* [24]. Recombinant strains were subjected to PCR screening and sequencing to confirm the correct insertion of the fragments and the absence of additional mutation. Strains and plasmids detailed in this study are available for researchers upon request.

4.3. Expression and purification of recombinant toxins

4.3.1. From AD1 and AD2 strains

Cultures of *C. difficile* strains AD1 and AD2 were prepared in 600 mL of TY medium, inoculated at a 600 nm optical density (OD_{600nm}) of 0.05 using overnight cultures, and allowed to grow for 75 to 92 h in an anaerobic chamber at 37°C to induce toxin release in nutrient limiting medium [11]. Bacteria were centrifuged and culture supernatants were precipitated with 45 g of ammonium sulfate for 100 mL of bacterial culture followed by shaking at room temperature for 5 min. Precipitates were centrifugated (12200 g) for 10 min at 4 °C, and the pellet was resuspended in 40 mL of denaturing buffer (8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8). pH was adjusted to 8 after resuspension to allow the binding of 6x His-tagged toxins to Ni-NTA agarose resin (reference: 30210; Qiagen). Resulting samples were passed through chromatography columns containing the Ni-NTA agarose resin and were eluted with denaturing buffer containing increasing concentrations of Imidazole (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM, and 1 M). For analysis, fractions were loaded into a sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel using 6% stacking gel and 10% separation gel followed by a standard Coomassie staining.

4.3.2. From AD3 and AD4 strains

Cultures of *C. difficile* strains AD3 and AD4 were prepared in 1000 mL, and 2000 mL of BHI medium respectively, inoculated at OD_{600nm} of 0.05 using overnight cultures, and incubated in an anaerobic chamber at 37°C. Cultures were allowed to grow until reaching

an OD_{600nm} of 0.5 before toxin expression was induced by the addition of ATc (0.5 µg.mL⁻¹ for recombinant toxin A rTcdA or 0.1 µg.mL⁻¹ for recombinant toxin B rTcdB). Cultures were incubated for 4 h after ATc addition, bacteria were centrifuged and pellets were frozen at -20°C. Cell pellets were resuspended in 40 mL of lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8). For lysis, bacteria were then incubated for one-hour at 37 °C, followed by a brief sonication to reduce viscosity. Lysates were centrifuged (12200g) for 30 min at 4°C. Lysate supernatants were then passed through chromatography columns containing Ni-NTA agarose resin (reference: 30210; Qiagen). The bound 6x His-tagged toxins were eluted with elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazole, pH 8). The eluents were desalted using a PD10 column (reference 17085101; Cytiva), and the recombinant toxins were eluted with 50 mM NaH₂PO₄, and 300 mM NaCl, and conserved at -20°C. Samples were analyzed by SDS-PAGE as previously described. Purified proteins were obtained at 80 µg.mL⁻¹ and 60 µg.mL⁻¹ for rTcdA and rTcdB respectively on average.

4.4. Cytotoxicity assay

Cytotoxic activity of purified recombinant toxins rTcdA and rTcdB was determined using Vero (African green monkey kidney) cell monolayer culture with a protocol adapted from Cartman *et al* [28]. Briefly, cells were seeded in a 96-well plate (TPP) with 100 µL cell suspension at the density of 2x10⁵ cells mL⁻¹ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Dutscher). The plates were incubated for 24 h at 37°C, 5 % CO₂ to obtain the cell monolayer before adding the toxins. In order to evaluate the cytotoxicity of the recombinant toxins compared to native TcdA and TcdB, cells were treated with either TcdA, TcdB, rTcdA or rTcdB using four different concentrations ranging from 4 µg.mL⁻¹ to 32 ng.mL⁻¹. These dilutions were obtained by preparing fivefold serial dilutions of toxin stocks, in DMEM medium supplemented with 0.1 % of Bovine serum albumin solution (BSA) (Sigma). In addition, cells in DMEM and 0.1% of BSA only were included as a negative control. The *C. difficile* native toxins TcdA and TcdB used in this study were produced in *C. difficile* VPI 10463 strain and generously gifted by Pr Michel Popoff (Pasteur Institute, Paris) [19,21]. After 18 h of incubation, morphological alterations of Vero cells were observed under phase contrast microscopy (Zeiss). Results presented here are representative of at least two independent experiments.

4.5. Disruption of the actin cytoskeleton by purified recombinant toxins

A monolayer of Vero cells was obtained by seeding 1 mL of a 1x10⁵ cells mL⁻¹ suspension per well in a 24-well plate (TPP), followed by incubation for 24 h at 37°C, 5 % CO₂. Sub-confluent cells were then incubated for 18h with 4 µg.mL⁻¹ of native toxins (positive controls) or purified recombinant toxins. In addition, a negative control was also added by keeping cells in DMEM and 0.1% of BSA only. After incubation, cells were fixed and stained with Rhodamine Phalloidin (reference: P1951, Sigma) and DAPI contained in the Fluoromount-GTM mounting medium (reference: 00495952, Invitrogen). Five random fields were acquired for each condition, and FIJI software was used to determine the mean area per cell [29]. For each field randomly selected, using a thresholding method and particle analysis, we used the actin channel to determine the area of the field occupied by cells, expressed in µm² and the DAPI channel to count the number of nuclei in the field. We then expressed the average cell area, expressed in µm²/cell, by dividing the total cell area by the number of cells. Finally, additional images were acquired with the x63 objective in order to illustrate cell morphological alterations induced by toxins.

4.6. Comparison of native or recombinant toxins for the quantification of serum antibodies by quantitative ELISA

The TcdA and TcdB antibody titers were determined by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a protocol adapted from Péchiné *et al.* [30]. In order to allow quantitative measurements of serum antibody titers, we added a calibration range by serially diluting a polyclonal IgG antibody from human sera solution (reference: I2511, Sigma), to reach concentrations ranging from 0.68 ng.mL⁻¹ to 22 ng.mL⁻¹. Briefly, ELISA microplates (MaxiSorp Nunc, reference: 439454) were coated with 1 µg.mL⁻¹ of native or purified recombinant toxins in a coating buffer (PBS – Deoxycholate 0.1%) and incubated overnight at 35°C. Microplates were washed four times by adding 250 µL of PBS-Tween 0.1% in each well. After this step, wells were incubated with 200 µL of a blocking buffer (PBS - Bovine Serum Albumin 3% (BSA reference: A9418, Sigma)) during one hour at 35°C. After washing the blocking buffer, serum samples from *C. difficile* recovered patients were tested in technical duplicates at serial dilutions from 1/20 to 1/2560 in dilution buffer (PBS – Tween 0.1% - BSA 0.1%). After a washing step, plates were incubated with a secondary antibody (anti-Human IgG-Phosphatase alkaline antibody (reference: A9544, Sigma)), incubated for one hour at 35°C, and washed four times with PBS-Tween 0.1%. Finally, revelation was done by adding the p-nitrophenyl phosphate substrate (reference: N2770, Sigma) to each well. The light-absorption was measured at 450 nm and anti-TcdA or anti-TcdB IgG concentrations were determined using calibration ranges. Serum samples used in these assays were obtained from seven CDI patients from the SERODIFF study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01946750). For the SERODIFF study, participants were recruited from December 1st 2012 to June 30th 2017. Written informed consent forms were collected for each participant.

4.7. Neutralization antibody assay

For the neutralization antibody assay, 96 well plates (TPP) were prepared to obtain monolayers of Vero cells using the procedure described in the cytotoxicity assay section. Antibodies used in these assays were obtained from serum samples collected from a CDI patient included in the SERODIFF study. In order to confirm that the recombinant toxins were also susceptible to the neutralizing activity of these antibodies, 75 µL of a 4 µg.mL⁻¹ solution of rTcdA or rTcdB was mixed with 75 µL of 1/10 dilution of serum from a CDI patient and incubated at 37 °C for 60 min [31,32]. The mixtures were then added to monolayers of Vero cells and the plates were incubated in 5 % CO₂ at 37 °C for 18 h. A negative control (cells in DMEM and 0.1% of BSA only) and positive controls (4 µg.mL⁻¹ and 0.8 µg.mL⁻¹ of rTcdA or rTcdB alone) were also added. Cell morphological alterations were observed under phase contrast microscopy (Zeiss).

4.8. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were conducted on the following 39 genomes of *C. difficile* strains: 630Δ*erm*, A685, CD015, CD196, CIP1079324, E1, E7, E12, E14, VPI 10463, E15, E16, E23, E24, E25, E28, NAP07, NAP08, QCD_23m63, QCD_32g58, QCD_37x79, QCD-63q42, QCD_66c26, QCD_76w55, QCD_97b34, T3, T5, T6, T10, T11, T15, T17, T19, T20, T22, T23, T42, T61 and R20291. Selected genomes and protein sequences were obtained from Marc Monot [33]. In addition, protein sequences of large clostridial toxins from *Paenibacillus sordellii* were obtained from NCBI, for TcsH (AGK40891.1) and TcsL (Q46342.1). See supplementary Table S4 for genome accession numbers.

For phylogenetic trees, protein sequences were first aligned with MUSCLE provided by EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) [34]. Phylogeny reconstruction was performed with FastTree (version 2.1.11) using a local installation and running with default settings [35]. Generated trees were exported and uploaded to iTOL (version 6, <https://itol.embl.de/>) for visualization [36] and bootstrap metadata was visualized using colored tree branches (red = 0 / blue = 1). Sequence alignments obtained in MUSCLE were visualized using BioEdit [37] to generate the amino acid alignment comparisons for TcdA and TcdB in *C. difficile* strains 630Δ*erm*, R20291 and VPI 10463.

4.9. Statistical analysis and software

Analyses were performed using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Linear correlation was determined by Pearson correlation coefficient. For microscopy, figure assembly was done using the FigureJ plugin [38].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, File S1: Protein comparisons for TcdA and TcdB from the 630Δerm, VPI10463 and R20291 *C. difficile* strains; Figure S1: Strain construction for the production of the recombinant toxins rTcdA and rTcdB of *C. difficile*; Figure S2: Purification of recombinant His-tagged toxins by Ni-NTA affinity chromatography under denaturing conditions from the genetic construction without the *P_{tet}* promoter; Figure S3: Disruption of cytoskeleton on Vero cells with 20x objective; Table S1: List of bacterial strains used in this study; Table S2: List of primers used in this study; Table S3: List of Plasmids used in this study; Table S4: Table List of Genome accession numbers used for Fig 1.

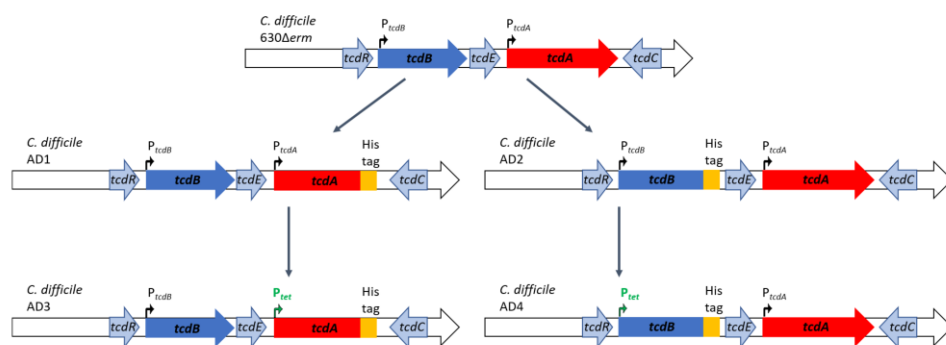


Figure. S1 Strain construction for the production of the recombinant toxins rTcdA and rTcdB of *C. difficile*. The strains were obtained in two steps using the allele exchange method. Strains ADS1 and ADS2 were obtained by adding a His-tag at the 3' end of the *tcdA* or *tcdB* genes of the *C. difficile* strain 630Δerm. Strains ADS3 and ADS4 were obtained by replacing the respective promoter of *tcdA* and *tcdB* by the promoter *P_{tet}* inducible to anhydro-tetracycline (ATc). AD3 and ADS4 were used for the purification of recombinant toxin A (rTcdA) and B (rTcdB).

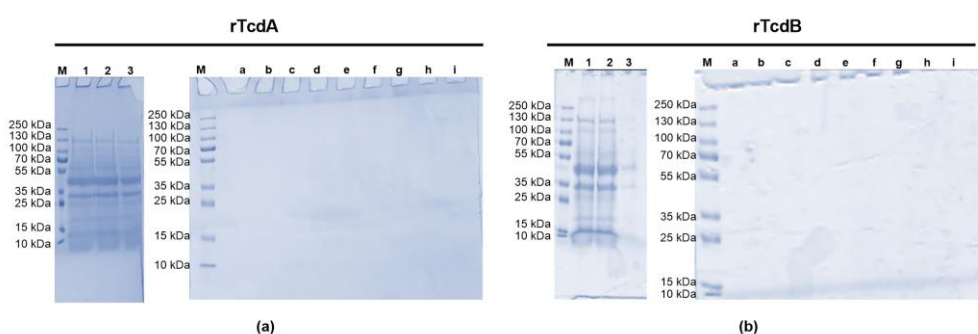


Figure. S2 Purification of recombinant His-tagged toxins by Ni-NTA affinity chromatography under denaturing conditions from the genetic construction without the *P_{tet}* promoter. Toxins were visualized by Coomassie staining for (A) recombinant toxin A (rTcdA); (B) recombinant toxin B (rTcdB). M: markers / 1: raw protein samples / 2: flow through / 3: wash. Imidazole eluted fractions: a: 10 mM / b: 20 mM / c: 30 mM / d: 40 mM / e: 60 mM / f: 80 mM / g: 100 mM / h: 200 mM / i: 1 M

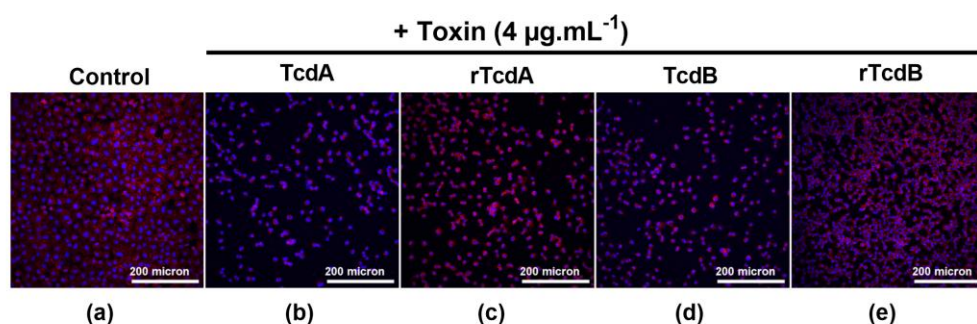


Figure. S3 Disruption of cytoskeleton on Vero cells with 20x objective. Cells in 24 wells plate were in the absence of toxin (control) or in the presence of 4 µg.ml⁻¹ of either native or recombinant toxins A and B. Cells were incubated for 18 hours, fixed, and stained with Rhodamine Phalloidin (actin staining in red) and DAPI (nuclei staining in blue) then observed under confocal microscopy with 20x objective to quantify the effect of toxins on the cells.

Table S1. List of bacterial strains used in this study

Strains	Characteristics	Reference(s)/source
TG1	<i>E.coli</i> SupE <i>hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F'[tra36 pro AB⁺lacI^q lacZΔM15]</i>	Panteleon <i>et al.</i> , 2015
HB101 _{tra}	<i>E. coli</i> , F-Δ (gpt-proA) 62 LEU B6 gln V44 ara-14 gal-K2 lacY1 delta (mcrC-mrr) rps L20 (srtr) xyl-5 mLt-1 recA13, pRK24 (transfer function)	Laboratory
630Δ _{erm}	<i>C. difficile</i> , Wild-type strain sensible to erythromycin	Laboratory
AD1	<i>C. difficile</i> , 630Δ _{erm} with 6xhis-tag in the 3' end of <i>tcdA</i>	This study
AD2	<i>C. difficile</i> , 630Δ _{erm} with 6xhis-tag in the 3' end of <i>tcdB</i>	This study
AD3	<i>C. difficile</i> strain AD1 with <i>tcdA</i> native promoter replaced with P _{tet} promoter (630Δ _{erm} P _{tet} -TcdA_his tag)	This study
AD4	<i>C. difficile</i> strain AD2 with <i>tcdB</i> native promoter replaced with P _{tet} promoter (630Δ _{erm} P _{tet} -TcdB_his tag)	This study

496
497
498
499
500
501
502
503
504

505
506

Table S2. List of primers used in this study

507

Name	Sequence 5' – 3'	Utilization
2836	ctgcaccegaggGAGACCGGAAAAGATCCG GGGGATCGATCCTCTAG	Primer for amplification of the spectinomycin cassette
2837	catgtcgcgcatgcGAGACCTTAGCCTAATTG AGAGAAGTTTCTATAG	Primer for amplification of the spectinomycin cassette
2854	GGCTACGGTCTCCCCGGGgcctcaactggtt atacaagtattaatgg GGCTACGGTCTCCGGCAttaGtGGTGAT	Primer for the amplification of PCR fragment 1 for pADS1 construction
2851	GGTGATGGTGATGccatataatcccaggggcttt tactcc GGCTACGGTCTCCTGCCaatatagtgtgata	Primer for the amplification of PCR fragment 1 for pADS1 construction
2852	aaaaattattcctgtg GGCTACGGTCTCGCATGCggtaacgaattta	Primer for for amplification of PCR fragment 2 for pADS1 construction
2853	gtaatgaaggaaaagg GGCTACGGTCTCCCCGGGggtgaaaacgg	Primer for amplification of PCR fragment 2 for pADS1 construction
2858	agaaatgcaaataggag GGCTACGGTCTCCGGCAttaGtGGTGAT	Primer for amplification of PCR fragment 1 for pADS2 construction
2859	GGTGATGGTGATGttcactaatcactaattgagc tgtatcaggatc GGCTACGGTCTCCTGCCataaaaatagttaa	Primer for amplification of PCR fragment 1 for pADS2 construction
2860	atatatcctcttatacttaa GGCTACGGTCTCGCATGCgtccttcatcagc	Primer for amplification of PCR fragment 2 for pADS2 construction
2861	tattttgtgttttg	Primer for amplification of PCR fragment 2 for pADS2 construction
3046	gatgagaagggcataatgggctacggctctctttgc	Forward primer for CO1 fragment amplification for pADS3 construction
3047	ttacttttcatccttagcattcgggctacggctctcttattttta tgctagc	Reverse primer for CO1 fragment amplification for pADS3 construction
3048	taagaagcctgcatttgcagggctacggctctc	Forward primer for P _{tet} fragment amplification for pADS3 construction
3049	aaagacataaaattttctccttactgcaggggctacggctc cg	Reverse primer for P _{tet} fragment amplification for pADS3 construction
3050	ctttaatatctaagaagagttaataaaacgggctacggctc cg	Forward primer for CO2 fragment amplification for pADS3 construction
3051	ctgccgctctaatatttatcatttccgggctacggctc	Reverse primer for CO2 fragment amplification for pADS3 construction
3052	ttatgtaattgttacttgaaaattgatcgggctacggctcatt gc	Forward primer for CO1 fragment amplification for pADS4 construction

3053	ttacaagttaaataatcttcatagctcttttttttttttaaat gggctacggctctcttatttttatgctagc	Reverse primer for CO1 fragment amplification for pADS4 construction
3054	aagaagcctgcattgcagggctacggctcgc	Forward primer for P _{tet} fragment amplification for pADS4 construction
3055	aaaatcttctcttactgcagggctacggctcgcactaaa ctcat	Reverse primer for P _{tet} fragment amplification for pADS4 construction
3056	tagttaatagaaaacagtagaaaaatgggctacggctc cg	Forward primer for CO2 fragment amplification for pADS4 construction
3057	tgttctgaggtatattctggggctacggctctctgccc	Reverse primer for CO2 fragment amplification for pADS4 construction
3064	tatacaattgagactggatggat	Forward primer outside CO1 fragment to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdA</i> in <i>C. difficile</i>
3065	aatatctcagatcttctcactttt	Reverse primer outside CO2 to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdA</i> in <i>C. difficile</i>
3066	gtcttgaaaatatttagttgaa	Forward primer outside CO1 fragment to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdB</i> in <i>C. difficile</i>
3067	atcttaacttctagtggtgatgc	Reverse primer outside CO2 to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdB</i> in <i>C. difficile</i>
3068	ctgttttctgtaggccgtgt	Forward primer inside P _{tet} promoter to verify P _{tet} 's insertion in front of <i>tcdA</i> and <i>tcdB</i> in <i>C. difficile</i>
3069	acacgcctacagaaaaacag	Reverse primer inside P _{tet} promoter to verify P _{tet} 's insertion in front of <i>tcdA</i> and <i>tcdB</i> in <i>C. difficile</i>
3070	gctgtaataaggctaaaaatagagca	Forward primer inside CO1 fragment to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdB</i> in <i>C. difficile</i>
3071	aaggctttattctaccagatcttt	Reverse primer inside CO2 to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdB</i> in <i>C. difficile</i>
3072	gaaagtgaagtatattaaaaaat	Forward primer inside CO1 fragment to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdA</i> in <i>C. difficile</i>
3073	cattattgtttgtagttaacttat	Reverse primer inside CO2 to verify P _{tet} promoter's insertion in front of <i>tcdA</i> in <i>C. difficile</i>
3143	tcaaagcggcaactaagagt	Forward primer outside CO1 fragment in pJV7 vector to characterize the first Crossing-over between pADS3 and gDNA in AD3 and between pADS4 and gDNA in AD4
3144	tgtaaacgacggccagt	Reverse primer outside CO2 fragment in pJV7 vector to characterize the first Crossing-over between pADS3 and gDNA in AD3 and between pADS4 and gDNA in AD4

3145	tggcatctgctccctcgtttcat	Reverse primer inside <i>tcdA</i> native promoter in front of CO2 fragment to characterize the first Crossing-over between pADS3 and gDNA in AD3
3146	aggagtgtataagattattttc	Forward primer inside <i>tcdA</i> native promoter in front of CO2 fragment to characterize the first Crossing-over between pADS3 and gDNA in AD3
3147	aagacactcagttgattaattgc	Reverse primer inside <i>tcdB</i> native promoter in front of CO2 fragment to characterize the first Crossing-over between pADS4 and gDNA in AD4
3148 DS30	gcaaattaatcaactgagtgtctt	Forward primer inside <i>tcdB</i> native promoter in front of CO2 fragment to characterize the first Crossing-over between pADS4 and gDNA in AD4

508

509

Table 3. List of Plasmids used in this study.

510

Name	Characteristics	Reference (s)/Source
pAT28	Spec ^r ori pUC ori pAmβ1 (resistance spc)	Trieu-Cuot <i>et al.</i> , 1990
pTC129	pBlunt+ spc (BsaI) (resistance Kn+spc)	This study
pTC130	pMSR BamH1/XhoI +pTC129 BamH1/xhoI (resistance Cm+spc)	This study
pADS1	pTC130 with 6xhis - tag for allele exchange in <i>C. difficile</i> 630Δ <i>erm</i> to generate strain AD1	This study
pADS2	pTC130 with 6xhis - tag for allele exchange in <i>C. difficile</i> 630Δ <i>erm</i> to generate strain AD2	This study
pRPF185	pRPF177 with fdx transcriptional terminator added after <i>tetR</i> , <i>gusA</i>	Fagan <i>et al.</i> , 2011
pJV7	pMSR spc (BsaI) (resistance Cm+spc) P _{tet} promoter and homologous regions cloned in pJV7	Malet-Villemagne <i>et al.</i> , 2023
pADS3	vector for allele exchange upstream of <i>tcdA</i> in <i>C. difficile</i> strain AD1 to generate strain AD3	This study
pADS4	P _{tet} promoter and homologous regions cloned in pJV7 vector for allele exchange upstream of <i>tcdB</i> in <i>C. difficile</i> strain AD2 to generate strain AD4	This study

511

512

Table 4. List of Genome accession numbers used for Figure 1.

513

Genome Name / Sample Name	Genome ID
<i>Clostridioides difficile</i> E12	CAMZ00000000
<i>Clostridioides difficile</i> E28	CAMX00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T11	CAML00000000
<i>Clostridioides difficile</i> NAP08	ADNX00000000
<i>Clostridioides difficile</i> NAP07	ADVM00000000
<i>Clostridioides difficile</i> QCD-66c26	CM000441
<i>Clostridioides difficile</i> 630 delta erm	LN614756
<i>Clostridioides difficile</i> T19	CANA00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T61	CAND00000000
<i>Clostridioides difficile</i> QCD-97b34	CM000657
<i>Clostridioides difficile</i> T17	CAMT00000000
<i>Clostridioides difficile</i> E15	CAMM00000000
<i>Paeniclostridium sordellii</i> ATCC 9714	APWR00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T6	CAMR00000000
<i>Clostridioides difficile</i> E24	CAMP00000000
<i>Clostridioides difficile</i> 630	AM180355, AM180356
<i>Clostridioides difficile</i> E14	CAMS00000000
<i>Clostridioides difficile</i> QCD-23m63	CM000660
<i>Clostridioides difficile</i> CD15	FUUU00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T15	CAMK00000000
<i>Clostridioides difficile</i> CIP 107932	CM000659
<i>Clostridioides difficile</i> E25	CAMJ00000000
<i>Clostridioides difficile</i> E16	CAMH00000000
<i>Clostridioides difficile</i> QCD-32g58	CM000287
<i>Clostridioides difficile</i> T42	CAMQ00000000

<i>Clostridioides difficile</i> QCD-63q42	CM000637
<i>Clostridioides difficile</i> E23	CAMY00000000
<i>Clostridioides difficile</i> QCD-37x79	CM000658
<i>Clostridioides difficile</i> R20291	FN545816
<i>Clostridioides difficile</i> T22	CAMI00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T10	CANB00000000
<i>Clostridioides difficile</i> E1	CAMD00000000
<i>Clostridioides difficile</i> QCD-76w55	CM000661
<i>Clostridioides difficile</i> T5	CAMB00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T20	CAMC00000000
<i>Clostridioides difficile</i> E7	CAMV00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T23	CAMN00000000
<i>Clostridioides difficile</i> T3	CAMW00000000
<i>Clostridioides difficile</i> CD196	FN538970
<i>Clostridioides difficile</i> A685	https://image.genoscope.cns.fr/microscope/search/exportForm.php?O_id=1276

514

515

Author Contributions: Afi Akofa Diane Sapa: Investigation, Visualization, Writing – Original Draft Preparation. Anaïs Brosse: Methodology, Conceptualization, Project Administration, Writing – Original Draft Preparation, Writing – Review & Editing. Héloïse Coullon: Investigation, Visualization, Writing – Review & Editing. Gauthier Pean de Ponfilly: Investigation, Writing – Review & Editing. Thomas Candela: Methodology, Conceptualization, Writing – Review & Editing. Alban Le Monnier: Conceptualization, Funding acquisition, Writing – Review & Editing.

516

517

518

519

520

521

Funding: This work was funded by a PhD grant of the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) to A. Sapa.

522

523

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Serum samples used were obtained from the SERODIFF study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01946750).

524

525

526

Acknowledgments: We thank J. Peltier for providing the knowledge on the obtention of the mutant by allele exchange in *Clostridioides difficile*, P. Monassa and L. Henger for the construction of plasmids pADS1 and pADS2. We also thank Pr. M. Popoff (Pasteur Institute) for generously providing *C. difficile* native toxins. We are also grateful to V. Nicolas (platform MIPSIT of Paris Saclay University) Finally, we thank our colleagues for their insightful review of the manuscript, particularly J. Malet-Villemagne who also provided us with the pJV7 plasmid. Finally, we thank C. Janoir, whose laboratory this work was conducted in, for her constant interest and support

527

528

529

530

531

532

533

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

534

References

- [1] Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 2016;40:95–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>. 535
- [2] Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935;49:390–402. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1935.01970020105010>. 536
- [3] Bartlett JG. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1994;18 Suppl 4:S265-272. https://doi.org/10.1093/clinids/18.supplement_4.s265. 537
- [4] Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 2008;70:298–304. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.08.012>. 538
- [5] Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect* 2009;58:403–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.03.010>. 539
- [6] Balsells E, Shi T, Leese C, Lyell I, Burrows J, Wiuff C, et al. Global burden of *Clostridium difficile* infections: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Health* 2019;9:010407. <https://doi.org/10.7189/jogh.09.010407>. 540
- [7] Jones AM, Kuijper EJ, Wilcox MH. *Clostridium difficile*: a European perspective. *J Infect* 2013;66:115–28. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.019>. 541
- [8] McGlone SM, Bailey RR, Zimmer SM, Popovich MJ, Tian Y, Ufberg P, et al. The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2012;18:282–9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03571.x>. 542
- [9] Brown KA, Khanafer N, Daneman N, Fisman DN. Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2326–32. <https://doi.org/10.1128/AAC.02176-12>. 543
- [10] Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 1996;181:29–38. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00398-8). 544
- [11] Dupuy B, Sonenshein AL. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol Microbiol* 1998;27:107–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00663.x>. 545
- [12] Orrell KE, Melnyk RA. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2021;85:e0006421. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-21>. 546
- [13] Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annu Rev Microbiol* 2011;65:501–21. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102824>. 547
- [14] Aktories K, Schwan C, Jank T. *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annu Rev Microbiol* 2017;71:281–307. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093458>. 548
- [15] Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:723–50. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>. 549
- [16] Mansfield MJ, Tremblay BJ-M, Zeng J, Wei X, Hodgins H, Worley J, et al. Phylogenomics of 8,839 *Clostridioides difficile* genomes reveals recombination-driven evolution and diversification of toxin A and B. *PLoS Pathog* 2020;16:e1009181. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009181>. 550
- [17] Luo J, Yang Q, Zhang X, Zhang Y, Wan L, Zhan X, et al. TFPI is a colonic crypt receptor for TcdB from hypervirulent clade 2 *C. difficile*. *Cell* 2022;185:980-994.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.010>. 551
- [18] Tian S, Xiong X, Zeng J, Wang S, Tremblay BJ-M, Chen P, et al. Identification of TFPI as a receptor reveals recombination-driven receptor switching in *Clostridioides difficile* toxin B variants. *Nat Commun* 2022;13:6786. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33964-9>. 552
- [19] Sullivan NM, Pellett S, Wilkins TD. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 1982;35:1032–40. 553

- [20] Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 1988;56:2299–306. 576
577
- [21] Just I, Selzer J, Hofmann F, Aktories K. *Clostridium difficile* Toxin B as a Probe for Rho GTPases. *Bact. Toxins*, John Wiley & Sons, Ltd; 1997, p. 159–68. <https://doi.org/10.1002/9783527614615.ch13>. 578
579
- [22] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982. 580
581
- [23] Trieu-Cuot P, Carlier C, Poyart-Salmeron C, Courvalin P. A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4296. 582
583
- [24] Peltier J, Hamiot A, Garneau JR, Boudry P, Maikova A, Hajnsdorf E, et al. Type I toxin-antitoxin systems contribute to the maintenance of mobile genetic elements in *Clostridioides difficile*. *Commun Biol* 2020;3:718. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01448-5>. 584
585
586
- [25] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLOS ONE* 2008;3:e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>. 587
588
- [26] Fagan RP, Fairweather NF. *Clostridium difficile* Has Two Parallel and Essential Sec Secretion Systems *. *J Biol Chem* 2011;286:27483–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263889>. 589
590
- [27] Malet-Villemagne J, Yucheng L, Evanno L, Denis-Quanquin S, Hugonnet J-E, Arthur M, et al. Polysaccharide II Surface Anchoring, the Achilles' Heel of *Clostridioides difficile*. *Microbiol Spectr* 2023;0:e04227-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04227-22>. 591
592
- [28] Cartman ST, Kelly ML, Heeg D, Heap JT, Minton NP. Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcdC* genotype and toxin production. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:4683–90. <https://doi.org/10.1128/AEM.00249-12>. 593
594
595
- [29] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>. 596
597
- [30] Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, et al. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2005;54:193–6. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45800-0>. 598
599
- [31] Johnson S, Sypura WD, Gerding DN, Ewing SL, Janoff EN. Selective neutralization of a bacterial enterotoxin by serum immunoglobulin A in response to mucosal disease. *Infect Immun* 1995;63:3166–73. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3166-3173.1995>. 600
601
- [32] Zhang B-Z, Cai J, Yu B, Hua Y, Lau CC, Kao RY-TT, et al. A DNA vaccine targeting TcdA and TcdB induces protective immunity against *Clostridium difficile*. *BMC Infect Dis* 2016;16:596. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1924-1>. 602
603
- [33] Moura I, Monot M, Tani C, Spigaglia P, Barbanti F, Norais N, et al. Multidisciplinary analysis of a nontoxigenic *Clostridium difficile* strain with stable resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:4957–60. <https://doi.org/10.1128/AAC.02350-14>. 604
605
606
- [34] Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, Basutkar P, Lee J, Edbali O, et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res* 2022;50:W276-279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>. 607
608
- [35] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLOS ONE* 2010;5:e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>. 609
610
- [36] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 2021;49:W293–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>. 611
612
- [37] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;95–8. 613
614
- [38] Mutterer J, Zinck E. Quick-and-clean article figures with FigureJ. *J Microsc* 2013;252:89–91. <https://doi.org/10.1111/jmi.12069>. 615
- [39] Johnson S, Gerding DN, Janoff EN. Systemic and Mucosal Antibody Responses to Toxin A in Patients Infected with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 1992;166:1287–94. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.6.1287>. 616
617

- [40] van Opstal E, Kolling GL, Moore JH II, Coquery CM, Wade NS, Loo WM, et al. Vancomycin Treatment Alters Humoral Immunity and Intestinal Microbiota in an Aged Mouse Model of *Clostridium difficile* Infection. *J Infect Dis* 2016;214:130–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw071>.
- [41] Wei Y, Yang F, Wu Q, Gao J, Liu W, Liu C, et al. Protective Effects of Bifidobacterial Strains Against Toxicogenic *Clostridium difficile*. *Front Microbiol* 2018;9:888. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00888>.
- [42] Torres J, Camorlinga-Ponce M, Muñoz O. Sensitivity in culture of epithelial cells from rhesus monkey kidney and human colon carcinoma to toxins A and B from *Clostridium difficile*. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* 1992;30:419–26. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90538-g](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90538-g).
- [43] Ballard J, Bryant A, Stevens D, Tweten RK. Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infect Immun* 1992;60:784–90. <https://doi.org/10.1128/iai.60.3.784-790.1992>.
- [44] Martinez RD, Wilkins TD. Purification and characterization of *Clostridium sordellii* hemorrhagic toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* toxin A (enterotoxin). *Infect Immun* 1988;56:1215–21. <https://doi.org/10.1128/iai.56.5.1215-1221.1988>.
- [45] Meador J, Tweten RK. Purification and characterization of toxin B from *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 1988;56:1708–14. <https://doi.org/10.1128/iai.56.7.1708-1714.1988>.
- [46] Popoff MR. Purification and characterization of *Clostridium sordellii* lethal toxin and cross-reactivity with *Clostridium difficile* cytotoxin. *Infect Immun* 1987;55. <https://doi.org/10.1128/iai.55.1.35-43.1987>.
- [47] Sullivan NM, Pellett S, Wilkins TD. Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 1982;35:1032–40.
- [48] Phelps CJ, Lyerly DL, Johnson JL, Wilkins TD. Construction and expression of the complete *Clostridium difficile* toxin A gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1991;59:150–3. <https://doi.org/10.1128/iai.59.1.150-153.1991>.
- [49] Letourneur O, Ottone S, Delauzun V, Bastide M-C, Foussadier A. Molecular cloning, overexpression in *Escherichia coli*, and purification of 6x his-tagged C-terminal domain of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Protein Expr Purif* 2003;31:276–85. [https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(03\)00165-7](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(03)00165-7).
- [50] Burger S, Tatge H, Hofmann F, Genth H, Just I, Gerhard R. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:584–8. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01234-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01234-8).
- [51] Yang G, Zhou B, Wang J, He X, Sun X, Nie W, et al. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A and B in *Bacillus megaterium*. *BMC Microbiol* 2008;8:192. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-192>.
- [52] Jose S, Madan R. Neutrophil-mediated inflammation in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 2016;41:85–90. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.001>.
- [53] Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA. *Clostridium difficile* toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun* 2001;69:1329–36. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1329-1336.2001>.

Chapitre II : Etude de l'impact des antibiotiques d'intérêt clinique sur la dynamique de la colonisation digestive par *Clostridioides difficile* chez la souris, sur la réponse immune adaptative et sur le microbiote digestif

A. Contexte

Un essai réalisé au sein de l'équipe, en utilisant le modèle de colonisation et d'infection adapté du modèle de Chen *et al.* a permis de montrer qu'il était possible de reproduire l'infection chez la souris et établir la cinétique d'apparition des anticorps dirigés contre les toxines TcdA et TcdB telle qu'elle est décrite chez l'Homme. Au cours de cet essai, il n'a pas été observé de réponse immune contre deux facteurs de surface que sont le précurseur de la couche S, SlpA et la protéine flagellaire FliC (Annexe 1). En revanche, lors d'autres essais du laboratoire, dont l'objectif était d'utiliser ces protéines comme antigènes vaccinaux, des réponses spécifiques contre ces facteurs et limitant la colonisation ont pu être observées. Une des hypothèses avancées pour expliquer les différences entre ces deux essais est de supposer que la quantité de SlpA ou de FliC présentée aux cellules dendritiques effectrices de l'immunité adaptative serait insuffisante à près un seul contact avec *C. difficile* (contrairement à l'essai de vaccination).

Dans l'optique d'améliorer l'accessibilité des antigènes, un autre essai antérieur à ma thèse, a consisté à infecter des souris par *C. difficile* puis les traiter par la vancomycine. L'analyse de cet essai a montré une réponse immune significativement plus importante contre les toxines par rapport aux souris infectées mais non traitées. Cependant, dans ce contexte également, aucune réponse contre les facteurs de colonisation SlpA ni FliC n'a pu être détectée. Ainsi, il semblerait qu'une seule exposition au pathogène ne soit pas suffisante pour obtenir une réponse immune contre ces facteurs.

C'est pourquoi, un des objectifs de l'essai conduit durant ma thèse a été de simuler des contacts répétés avec le pathogène et voir si les profils de réponse et les taux d'anticorps produits évoluent au fur et à mesure d'expositions multiples notamment dans le cas des antigènes SlpA et FliC. Nous avons également choisi d'étudier l'impact des différents antibiotiques de traitement afin de les comparer avec ceux obtenus précédemment avec la vancomycine.

B. Présentation générale du protocole infectieux

Pour répondre à nos objectifs, nous avons réalisé une expérimentation animale permettant de collecter les échantillons nécessaires à l'analyse de la dynamique de la colonisation digestive par *C. difficile* jusqu'à la clairance de la bactérie, l'analyse de la réponse immune adaptative de même que la modulation du microbiote intestinal.

Déclaration d'éthique et conditions d'hébergement

Le protocole suivant impliquant les souris et leurs soins ont été réalisés conformément aux directives institutionnelles en vigueur qui suivent les directives nationales et internationales. Ce protocole a été validé par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale (CEEA-26) de l'Université de Paris Saclay.

Toutes les souris ont été nourries avec un régime standardisé pour souris (SAFE® A03) et avaient un accès illimité à de l'eau potable. Tous les matériaux, y compris la nourriture, l'eau, la litière et les cages, ont été stérilisés à l'autoclave avant leur utilisation.

Schéma expérimental et constitution des groupes

A l'arrivée des souris, un prélèvement de selles des souris a été réalisé afin de s'assurer que toutes les souris étaient négatives pour *C. difficile*. Lors de l'expérimentation, les souris ont été réparties de façon aléatoire dans six différents groupes. Nous avons constitué 6 différents groupes de 8 souris femelles âgées de 4 semaines de la lignée C57BL/6J réparties par groupe au nombre de 4 souris par cage à leur arrivée. Ces groupes comprenaient un groupe contrôle infecté par *C. difficile* et non traité (groupe CTRL), ainsi que des groupes exposés pendant 2 jours consécutifs (J3 et J4) après le développement des premiers signes cliniques aux antibiotiques actifs contre *C. difficile* dont la vancomycine (groupe VAN), le métronidazole (groupe MTZ) et la fidaxomicine (groupe FDX). Nous avons également inclus un groupe exposé à la céfoxitine (groupe FOX) antibiotique non actif contre *C. difficile* mais ayant un impact important sur le microbiote digestif. L'objectif du groupe FOX était de voir si la réponse immune obtenue est impactée par un effet indirect de déstabilisation d'autres bactéries du microbiote intestinal générant ainsi un signal de stress susceptible d'augmenter la réponse de l'hôte.

Lors de cet essai, nous avons introduit dans le protocole infectieux une étape de réinfection 31 jours après la première infection (J31) après une induction de la dysbiose avec le cocktail d'antibiotiques, afin de suivre cette nouvelle colonisation et de voir l'évolution de la réponse immune adaptative. Nous avons également introduit un groupe spécifique avec des réinfections multiples (groupe R) pour lequel les animaux ont été infectés au total 4 fois par *C. difficile*. L'objectif était de voir si les profils de réponse et les taux d'anticorps produits évoluent proportionnellement au nombre d'expositions répétées.

Après une semaine d'adaptation, les différents groupes de souris ont subi un protocole infectieux récapitulé dans la Figure 45.

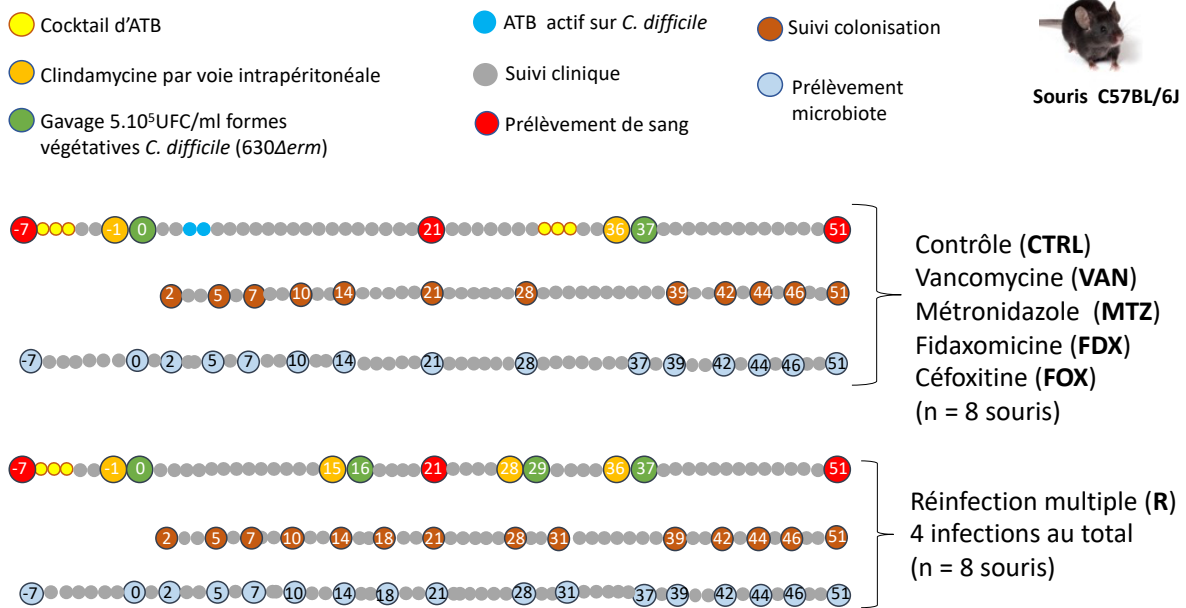


Figure 45 : Protocole infectieux appliqué pour les différents groupes de souris

Les prélèvements biologiques (sang pour la sérologie, selles pour le suivi de la colonisation digestive et du microbiote, contenu cæcal pour la caractérisation des IgA sécrétoires) réalisés aux différents temps, nous permettant ainsi de suivre la cinétique d'infection, la modulation de la réponse immunitaire sérique et mucosale, ainsi que la modulation du microbiote sont également récapitulés dans la Figure 45.

a) Description du protocole infectieux

- Dysbiose post-antibiotique

Six jours avant l'infection (J-6) un cocktail d'antibiotiques composé de kanamycine (0,4 mg/mL), de gentamicine (0,035 mg/mL), de colistine (850 UI/mL), de métronidazole (0,215 mg/mL) et de vancomycine (0,045 mg/mL) a été administré aux souris dans l'eau de boisson pendant 3 jours. La solution d'antibiotiques a été changée tous les jours. Outre l'eau de boisson, les souris ont été gavées à J-6 par 500 μ L du même mélange d'antibiotiques composé de kanamycine (1,6 mg/mL), de gentamicine (0,14 mg/mL), de colistine (3400 UI/mL), de métronidazole (0,860 mg/mL) et de vancomycine (0,18 mg/mL) soit les $\frac{3}{4}$ de la dose journalière afin d'obtenir un déséquilibre équivalent du microbiote chez toutes les souris. Les concentrations d'antibiotiques dans l'eau de boisson ont été calculées selon le poids moyen des souris (20g) et leur consommation moyenne quotidienne en eau. Ces posologies d'antibiotiques correspondent à une dose journalière de 40 mg/kg de kanamycine, 3,5 mg/kg de gentamicine, 4,2 mg/kg de colistine, 21,5 mg/kg de métronidazole et 4,5 mg/kg de vancomycine. Le soir du

troisième jour avant l'infection (J-3) l'eau de boisson contenant les antibiotiques a été remplacée par de l'eau de boisson sans antibiotiques.

Un jour avant l'infection (J-1), une dose de clindamycine à 10 mg/kg a été administrée par voie intra-péritonéale dans un volume de 200 µL à chaque souris.

- Préparation de l'inoculum de *C. difficile*

Pour cet essai, nous avons utilisé la souche toxigène de référence 630Δerm de *C. difficile*.

La souche 630Δerm de *C. difficile* a été inoculée dans 5 ml de milieu Brain Heart Infusion (BHI) pendant 16 heures à 37°C en anaérobiose. Une subculture a été réalisée au 1/100^{ème} dans un volume final de 10 ml et incubée à 37°C en anaérobiose jusqu'à l'obtention d'une densité optique (D.O) 0,7-0,8 à 600 nm. La culture bactérienne a été récoltée par centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, un lavage a été réalisé une fois dans 10 ml de tampon phosphate salin (PBS) régénéré. Le culot bactérien a été re-suspendu dans 10 ml de PBS régénéré et dénombré avec la cellule de dénombrement « petit Salumbeni ». Une dilution a été réalisée dans du PBS régénéré en fonction du nombre de bactéries obtenues afin d'obtenir un inoculum de 10⁶ UFC/mL.

Le jour de l'infection (J0), les souris ont été infectées par gavage à l'aide d'une canule adaptée à l'espèce par 500 µL de 10⁶ UFC/mL de formes végétatives de la souche 630Δerm de *C. difficile* afin d'obtenir une dose infectieuse de 5.10⁵ UFC/mL.

- Antibiotiques de traitement

Trois jours après l'infection (J3) puis à J4, les groupes correspondants VAN, MTZ, FDX et FOX ont reçu deux fois par jour (9 heures et 17 heures), soit de la vancomycine, du métronidazole, de la fidaxomicine ou de la céfoxitine à une dose quotidienne de 50 mg/kg (Figure 45).

- Réinfection à partir de J31

A partir de J31, les groupes VAN, MTZ, FDX et FOX ont à nouveau subi le processus infectieux dont 3 jours de dysbiose générée par le cocktail d'antibiotiques selon le protocole précédemment décrit avec un gavage à J31 (soit six jours avant l'infection (J-6 bis)) par 500 µl du même cocktail et une dose de clindamycine à 10 mg/kg qui était administrée par voie intra-péritonéale dans un volume de 200 µL à chaque souris à J36 (J-1 bis). A J37 (J0 bis) toutes les souris ont été infectées par gavage à l'aide d'une canule avec 5.10⁵ UFC/mL de formes végétatives de la souche 630Δerm de *C. difficile*.

Contrairement à la première infection, les souris des groupes VAN, MTZ, FDX et FOX n'ont pas été traitées par les antibiotiques de traitement.

- Réinfection multiple (groupe R)

A J16, J29 et à J37 les souris du groupe R ont été infectées avec de 500 µL de 10⁶ UFC/mL formes végétatives de la souche 630Δ*erm* de *C. difficile* après une dose de clindamycine à 10 mg/kg administrée par voie intra-péritonéale dans un volume de 200 µL à chaque souris la veille de l'infection.

b) Suivi clinique

Les souris ont été pesées à J0 avant l'inoculation par la souche 630Δ*erm* de *C. difficile* afin de déterminer leur poids initial. Elles ont ensuite été surveillées et pesées quotidiennement, et plusieurs paramètres cliniques ont été relevés afin de s'assurer que les souris étaient bien infectées à savoir la perte de poids par rapport au jour du gavage, l'aspect des selles (diarrhéique ou queue mouillée, selles molles ou normales), le niveau d'activité (normale, moyen ou absent), la présence ou l'absence de poils hérissés.

A J51 (J14 bis), les souris ont été mises à mort par injection d'une dose létale d'anesthésique selon le protocole de l'animalerie centrale, procédure sans réveil (injection intra-péritonéale d'une préparation contenant de la Xylazine 10 mg/kg + ketamine 1000, 100 mg/kg), avec une méthode de confirmation par dislocation cervicale.

c) Prélèvements biologiques

Des prélèvements de sang à J-6, J21 et à J51 ont été réalisés afin de suivre la modulation de la réponse immune sérique et mucosale. Concernant la réponse sérique, il s'agira de comparer les quantités d'anticorps obtenues à J51 à la fin de l'essai à celles produites à J21 après la première infection et à J-6 avant la première infection pris comme point basal. La réponse mucosale est quant à elle étudiée par la quantification des IgA à partir des eaux cæcales préparées à partir des contenus cæcaux prélevés à J51 à la fin de l'essai. La préparation des sérums et des eaux cæcales permettant la détection des anticorps est décrite dans la partie matériels et méthode de l'article (chapitre II - partie A).

Ensuite, des prélèvements de selles fraîches pour le suivi de la colonisation digestive à différents temps et nous permettant de suivre la cinétique d'infection jusqu'à la clairance digestive de *C. difficile* ont été réalisés.

Enfin, des prélèvements de selles fraîches ont été réalisés afin de suivre la modulation du microbiote intestinal. Les selles ont été collectées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL pré-pesés contenant le tampon de conservation SPD « *stool preprocessing device* » (bioMérieux). Puis, tous les prélèvements ont été conservés à -80°C jusqu'au jour des analyses.

C. Chapitre II partie A : Impact de différents antibiotiques sur la dynamique de la colonisation digestive par *Clostridioides difficile* et sur la réponse immune adaptative

(article en cours de préparation)

1. Présentation générale de l'article

Dans une étude précédente, en utilisant un modèle adapté du protocole d'infection décrit chez la souris (Chen *et al.*, 2008), il a été possible de reproduire l'infection chez la souris et d'établir la cinétique d'apparition des anticorps dirigés contre les toxines TcdA et TcdB telle qu'elle est décrite chez l'Homme (Annexe 1). Afin de mieux caractériser l'établissement de l'ICD dans le modèle souris, nous avons évalué l'impact de différents antibiotiques d'intérêt clinique (vancomycine (VAN), fidaxomicine (FDX), métronidazole (MTZ) ou la céfoxitine (FOX)) sur la colonisation digestive et la modulation de la réponse immune adaptative de l'hôte.

Des souris C57BL/6J ont été infectées avec une souche toxino-gène de *C. difficile* après une dysbiose induite par des antibiotiques. 48h post-infection, les souris ont été exposées pendant 2 jours aux différents antibiotiques testés (VAN, FDX, MTZ et FOX) puis 28 jours après la primo-infection, les souris ont été réinfectées par la même souche. Un groupe spécifique où les souris ont été infectées quatre fois par *C. difficile* à des fins d'analyse comparative a également été ajouté à cette étude (groupe R). Des prélèvements de selles à différents temps ont été réalisés afin de suivre la cinétique de colonisation jusqu'à la clairance de *C. difficile*. Pour analyser la modulation de la réponse immune adaptative dirigée contre les toxines TcdA et TcdB, nous avons mis au point la technique de l'ELISA quantitatif pondéral chez la souris. En utilisant cette technique, nous avons comparé les concentrations d'anticorps IgG présents dans les sérums obtenus à J-6 avant la première infection (point basal) à celles mesurées à J21 après la première infection puis à J51 à l'arrêt de l'essai animal après une ou plusieurs réinfections. Nous avons également quantifié les IgA mucosales dans les contenus cœcaux prélevés à J51 après une ou plusieurs réinfections.

La cinétique de la clairance digestive de *C. difficile* diffère selon les groupes : la persistance digestive de *C. difficile* est prolongée dans les groupes VAN et FDX pour lesquels nous avons observé une recolonisation précoce à l'arrêt de l'exposition aux antibiotiques à l'origine de nouveaux signes cliniques d'ICD. En revanche dans le groupe MTZ et FOX, le traitement a eu peu d'effet sur la colonisation.

On observe une différence de mise en place de la réponse immune adaptative lors de la première infection avec des taux d'anticorps sériques anti-toxines produits plus précocement et à des taux significativement plus élevés pour les groupes exposés aux antibiotiques. Si la réinfection conduit à une colonisation digestive, celle-ci n'est par contre plus associée à des

signes d'ICD malgré la détection des toxines libres dans les selles, suggérant la production d'anticorps neutralisant et d'un corrélat de protection. Les taux d'anticorps anti-toxines sériques sont équivalents quel que soit le groupe suggérant l'atteinte d'un plafond de réponse après réinfection.

Le suivi de la colonisation digestive par *C. difficile* de même que les résultats des ELISA quantitatifs ayant permis de suivre la modulation de la réponse immune adaptative font l'objet d'un article en préparation :

Impact of antibiotics on the dynamics of digestive colonization by *Clostridioides difficile* and on the adaptive immune response

Afi Akofa Diane Sapa¹, Anaïs Brosse¹, Sandra Höys¹, Aurélie Baliarda¹, Gauthier Pean de Ponfilly^{1,2}, Assaf Mizrahi^{1,2}, Alban Le Monnier^{1,2}

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Micalis, Jouy-en-Josas, France.

² Service de Microbiologie clinique, GH Paris Saint-Joseph, Paris, France

ABSTRACT

The current standard treatment for the first episode of *Clostridioides difficile* infection (CDI) involves the use of fidaxomicin or vancomycin. However, recurrence of CDI occurs in approximately 20-35% of patients. The evolution of CDI appears to be correlated with the development of an adaptive immune response. Here, we investigate the impact of fidaxomicin, vancomycin, and metronidazole on the dynamics of digestive clearance of *C. difficile*, as well as the modulation of the adaptive immune response, using a mouse model of infection. C57BL/6 mice were infected with *C. difficile* strain 630 Δ erm after antibiotics induced dysbiosis. 48 hours after infection, mice were treated two times a day with vancomycin, fidaxomicin, or metronidazole for two consecutive days. Mice were monitored for 28 days then re-infected by the same strain. Fecal samples were collected at selected time points to follow up the kinetics colonization. To assess the adaptive immune response, we developed a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (quantitative ELISA) to measure the levels of IgG and IgA antibodies against *C. difficile* toxins TcdA and TcdB in serum, and cecal contents which were collected at selected time points. Two days of exposition to both fidaxomicin and vancomycin were unable to completely eliminate *C. difficile*. In fidaxomicin and vancomycin-exposed mice, the digestive persistence of *C. difficile* was prolonged, resulting in early reinfection upon cessation of curative treatment, leading to new clinical signs of CDI. Metronidazole had less to no effect on colonization by *C. difficile*. Nevertheless, the persistence of colonization appears to enhance the adaptive immune response. Upon reinfection and subsequent colonization of the digestive tract, no clinical signs of CDI were observed. Our findings suggest that antibodies produced during the first infection may neutralize toxins effect and confer protection against reinfection. Furthermore, serum anti-toxin antibody levels were equivalent in all groups, suggesting a steady state after multiple reinfection.

INTRODUCTION

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is Gram-positive, anaerobic, spore-forming bacillus, described as causative agent of gastrointestinal tract infections. Antibiotic exposure is the most significant risk factor for *C. difficile* infection (CDI) [1] which can disrupt the gut microbiota allowing spores of *C. difficile* to germinate into vegetative forms, colonize the gut microbiota, multiply, and produce virulence factors in particular two toxins A (TcdA) and B (TcdB) which result in the development of clinical manifestation of CDI. Currently, first line treatment is based on oral administration during 10 days of fidaxomicin, vancomycin, and metronidazole if the two others are not available. However, despite successful treatment of the initial CDI episode, recurrence occurs in 20-35 % of patients [2–4]. Several non-exclusive hypotheses have been put forward to explain this recurrence, including the persistence of *C. difficile* in the gastrointestinal tract in the form of spores that are not affected by antibiotics treatment, maintenance of the initial dysbiosis that led to CDI or even additional disruption of the gut microbiota induced by antibiotics of treatment, and a suboptimal host immune response after the initial episode [5]. Indeed, the adaptive immune response plays a central role in the development of CDI [6–9]. Several studies have demonstrated that the production of toxin-neutralizing antibodies is protective against CDI, however not against *C. difficile* colonization of gastrointestinal tract. Moreover, other have shown that low levels of antibodies against TcdA and TcdB have been associated with a higher risk of recurrence of CDI [6,9–13]. These data have led to the development of new prevention and alternatives treatments based on active immunization (vaccine candidate) or passive immunization (bezlotoxumab) [14,15].

However, the results of these human studies are highly heterogenous, probably due to variability among individuals who has often been previously exposed to *C. difficile* from childhood and throughout their lives [16,17]. Each individual has a unique history of CDI, which makes it difficult to study the factors associated with the development of an appropriate and effective adaptive immune response.

Therefore, we have used an adapted mouse model of infection protocol published by Chen *et al.*, [18], closely mimicking the moderate, spontaneously resolving infection in humans, which will allow us to follow the early and late digestive clearance of *C. difficile*, the kinetics establishment of the adaptive immune response, and the factors that are likely to it, in particular exposure to clinically relevant antibiotics (vancomycin, fidaxomicin, and metronidazole).

MATERIAL AND METHODS

Mouse model of *C. difficile* infection and treatment

Animal housing: Four weeks old female C57BL/6J mice were purchased from Charles River (Saint Germain Nuelles, France), and for one week before the experiments were allowed to acclimate to the animal facility environment. The mice were divided into six the following groups and every experimental group consisted of two cages per group (n = 4 per cage): control infected (CTRL), infected and exposed with either vancomycin (VAN), fidaxomicin (FDX), metronidazole (MTZ), or ceftiofuran (FOX). We also added a specific group where mice were infected four times by *C. difficile* for comparative analysis (R). Mice were fed a standardized mouse diet (SAFE® A03) and provided drinking water *ad libitum*. All materials, including food, water, bedding, and cages were autoclaved before use. Mice were checked for *C. difficile* carriage before the start of the infection protocol.

Ethics statement: the following protocols involving mice and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines that follow national and international laws and policies. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEEA-26) of the University of Paris Saclay.

Antibiotic administration: the infection model is an adapted protocol of Chen *et al.* [18]. Mice were pretreated for three days with an antibiotics cocktail as previously described [19] (vancomycin [4.5 mg/kg], colistin [4.2 mg/kg], gentamicin [3.5 mg/kg], metronidazole [21.5 mg/kg] and kanamycin [40 mg/kg] for 3 days (D-6 to D-3) in drinking water in addition to $\frac{3}{4}$ of the daily dose in oral gavage on D6 prior to the infection to create an equivalent dysbiosis in all mice followed by clindamycin [10 mg/Kg] intraperitoneally one day prior to *C. difficile* infection).

Preparation of *C. difficile* inoculum and challenge: *C. difficile* 630 Δ erm strain was inoculated in 5 mL Brain Heart Infusion (BHI) medium and incubated anaerobically for 16 hours at 37°C. The inoculum was added to 10 mL at 1/100 dilution the next day and incubated at 37°C anaerobically till OD_{600nm} = 0.7 – 0.8. The bacteria culture was harvested by centrifugation at 2500 rpm for 5 min at room temperature (RT), washed one time with 10 mL anaerobic phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in 10 mL anaerobic PBS. The suspension was enumerated and diluted in anaerobic PBS according to the bacteria count to obtain an inoculum at 10⁶ CFU/mL. Mice were then orally infected with 5x10⁵ CFU/mL i.e 0.5 mL of the *C. difficile* 630 Δ erm vegetative cells.

Exposition to antibiotics: two days after infection (D2), the corresponding groups received twice a day (9 AM and 5 PM) on D3 and D4 post-challenge either vancomycin, metronidazole, fidaxomicin, or ceftiofur at a daily dose of 50 mg/kg (Figure 1A).

Re-infection: all mice surviving on day 31 received three days of antibiotics cocktail pretreatment, and clindamycin intraperitoneally one day prior to challenge with 5.10^5 CFU/mL of the vegetative cells of *C. difficile* 630 Δ erm and were monitored for 14 days.

Multiple infections: one set of experiments was performed in which mice from multiple reinfection group were infected with 5.10^5 CFU/mL of the vegetative cells of *C. difficile* 630 Δ erm three times after the first challenge with 7-15 days between each challenge. Before each reinfection, mice only received clindamycin [10 mg/Kg] intraperitoneally (Figure 1B).

Clinical score: all mice were monitored and weighed daily, and several clinical parameters were monitored, in particular, weight loss compared to the day of the challenge, the appearance of the feces (score 0 to 2), the activity level (score 0 to 2), the presence or absence of bristly hair.

End of the procedure: at the end of the infection protocol, mice were injected with a lethal dose of anesthetic, procedure without awakening (intraperitoneal injection of a preparation containing Xylazine 10 mg/kg + ketamine 100, 100mg/kg) according to institutional guideline of our facility.

***C. difficile* vegetative cells detection in mouse fecal samples:** fecal samples were collected starting from day 2 post-infection, and all pre-determined days during the infection protocol (D2, D5, D7, D10, D14, D21, D28, D39, D42, D44, D46, and D51) and the cecal content were collected at the endpoint (D51) (Figure 1). Each fecal sample was weighed, and diluted in anaerobic PBS and the amount of diluent per sample was normalized to provide the same stool mass to the diluent ratio for each sample (10 mg/mL). The diluent sample mixtures were homogenized. Serial dilutions in anaerobic PBS were then plated (100 μ L per plate) on *Clostridium difficile* agar plates (CLO, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). At days 10, 14, 21, and 28 after the infection and 44, 46, and D51 at the endpoint after reinfection, 1 mL of fecal diluent was incubated overnight in 5 mL of BHI with 0.1% taurocholate for enrichment step and then plated on CLO plates (100 μ L per plate). All plates were incubated anaerobically at 37°C for 48 hours before counting under a UV lamp at 365 nm.

Detection of *C. difficile* toxins in fecal samples: on day two post-reinfection (D39), *C. difficile*-free toxins were detected in fecal samples of CTRL, R, and VAN groups. Samples were diluted in an anaerobic PBS at 10 mg/mL using the *C. DIFF* QUICK CHEK COMPLETE®, TECHLAB according to the manufacturer's instructions.

DNA extraction: total DNA was extracted from a frozen fecal sample conserved in SPD « Stool preprocessing device » buffer (BioMerieux) [20]. Extraction was carried out according to the adapted protocol of QIAamp Fast DNA Stool Kit (Qiagen; ID 51604) to efficiently extract both vegetative and spores forms by adding a mechanical lysis step on pellet after cells lysis. The purity and concentration of the extracted DNA were determined by reading the absorbance at 260 and 280 nm using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher).

Quantification of *C. difficile* by quantitative PCR: quantitative PCR (qPCR) to detect gene sequence common to *C. difficile* was performed on the CFX96 Real-time system (Bio-Rad) using Cdiff61 (forward; TTGAGCGATTACTTCGGTAAAGA) and Cdiff197 (reverse; CCATCCTGTACTGGCTCACCT) primers [21]. Mix for qPCR, in a final volume of 10 µL, consisted of 5 µL of SSo Advanced™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.5 µL of each of forward and reverse primers, and 4µL of DNA samples (diluted at 1:5, 1:10, and 1:20, if necessary). qPCR assays were performed in duplicate under the following cycling conditions: 30 s denaturation at 95°C, 5 s at 95°C, and 1 min at 60°C for 39 repeats, and a melt curve between 60°C to 95°C of 5 s at 0.5 °C intervals. Standard curves were generated from known amount of plasmid DNA containing a 16S rRNA gene insert from *C. difficile* allowed quantifications.

Sample collection for immunological analysis: blood was withdrawn from the submandibular vein six days prior to *C. difficile* challenge, and at day 21 post-infection. At the endpoint, blood was collected by heart puncture under anesthesia directly. All blood samples were processed as follows: after 1 hour at room temperature, the samples were incubated for 3 hours at 4°C and centrifuged at 3000 g for 10 min. After settling, sera were collected and conserved at -80°C until the ELISA for the IgG level detection.

Cecal contents were collected at the endpoint and a cold PBS solution containing cOmpete, Mini, Protease inhibitor cocktail (ref 11836170001, Sigma) was directly added. Suspensions were shaken for 1 min and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was

retained and re-centrifuged in a new tube at 12000 rpm for 10 min at 4°C. The final supernatant was collected and conserved at -80°C until the ELISA for IgA level detection.

Measurement of antibody response in mice by quantitative ELISA: the levels of anti-TcdA and anti-TcdB IgG and IgA were determined by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a protocol adapted from Péchiné *et al.*, [22]. To allow quantitative measurements of serum and cecal antibody titers, we added a calibration range. For IgG measurement, a monoclonal IgG antibody from murine sera was serially diluted in coating buffer (0.1 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.5) (Sigma Aldrich) to reach concentrations ranging from 0.833 µg/mL to 0.052 µg/mL. For IgA measurement, a monoclonal IgA antibody (Sigma Aldrich) from murine sera was used to reach from 0.071 µg/mL to 0.0044 µg/mL. ELISA microplates (MaxiSorp Nunc) were coated with 1 µg/mL of native toxins from *C. difficile* VPI 10 463 (generously gifted by Michel Popoff of Pasteur institute) in a coating buffer and incubated for one hour at 37°C and then overnight at 4°C. Microplates were washed five times by adding 200 µL of PBS-Tween 0.1% in each well. After this step, wells were incubated with 200 µL of a blocking buffer (PBS - Bovine Serum Albumin 3% (BSA, Sigma Aldrich) overnight at 4°C. After incubation, the blocking buffer was washed four times, and then incubated for 10 min at room temperature with the fourth washing. Sera or cecal contents collected during the infectious protocol were serially diluted in dilution buffer (PBS – Tween 0.1% - BSA 0.1%) according to the groups and the days of sampling. 100 µL of the dilutions were added to the wells coated with both toxins and incubated for 30 min at 37°C. After a washing step, plates were incubated with 100 µL of secondary antibody for 30 min at 37°C (anti-Mouse IgG- Biotin antibody produced in goat (1:20000 dilution; Sigma Aldrich) or anti-Mouse IgA Biotin antibody produced in goat (1:10000 dilution; Bethyl), and washed four times with PBS-Tween 0.1%. After another washing step, plates were incubated for 30 min at 37°C with 100 µL of Streptavidin HRP (Thermo Fisher). Finally, the revelation was done by adding to each well 100µL of Tetramethylbenzidine substrate (TMB; Sigma Aldrich) for 10 min and the reaction was stopped with 100 µL of Stop reagent for TMB (Sigma Aldrich). The light absorption was measured at 450 nm and anti-TcdA or anti-TcdB IgG or IgA concentrations were determined using calibration curves.

Statistical analysis: results were expressed as median with interquartile range, as generated by GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The difference between two groups were analyzed using Mann-Whitney U. A *p*-value of <0.05 was set to indicate statistical significance.

RESULTS

Outcome of CDI in mice exposed to vancomycin, fidaxomicin, or metronidazole in comparison of untreated infected mice

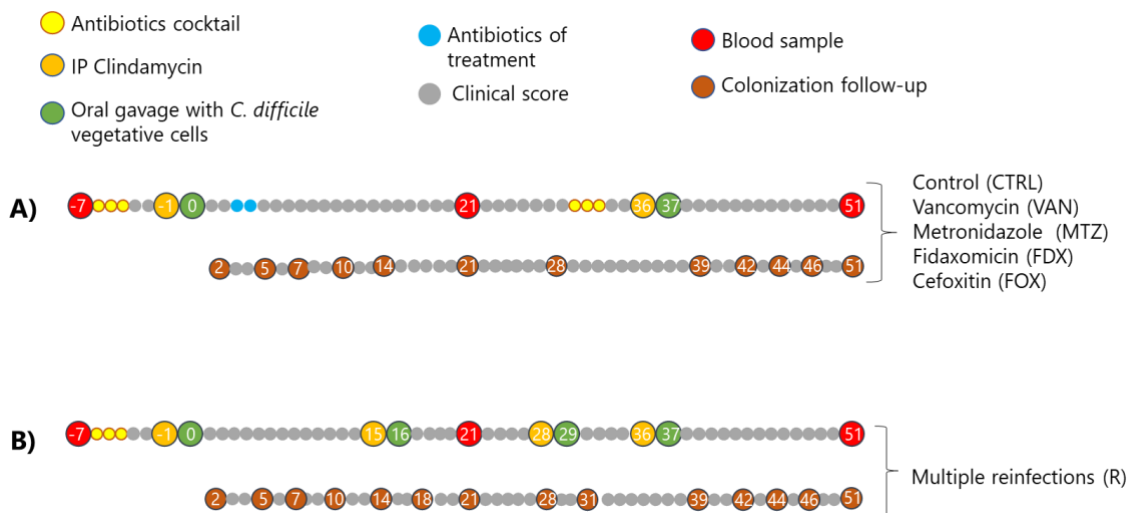


Figure 1: Experimental design.

Experimental design and sampling plan for the groups with one reinfection (A) and the group with four reinfections (B). The yellow circles indicate the days of administration of the antibiotic cocktail. The orange circles indicate the intraperitoneal injection of clindamycin. The blue circles indicate the administration of the treatment antibiotics (VAN, MTZ, FDX, FOX). The green circles indicate the days of gavage with the *C. difficile* strain. Blood samples were taken on the days indicated by the red circles. Fresh stool samples for colonization monitoring were taken on the days indicated in brown. The clinical score of the animals was assessed daily.

First, we determined the outcomes of *C. difficile* infection (CDI) in mice following exposure to vancomycin, metronidazole, and fidaxomicin (Figure 1). Female C57BL/6J mice were infected with 5.10^5 CFU/mL *C. difficile* 630 Δ *erm* vegetative cells after pretreatment with an antibiotics cocktail. As previously established, CDI clinical scores peaked on the second day with significant weight loss and diarrhea for all mice, confirming that all the mice have been infected. By day four, several mice began to regain their initial weight (Figure 2), and no mortality was observed in all groups.

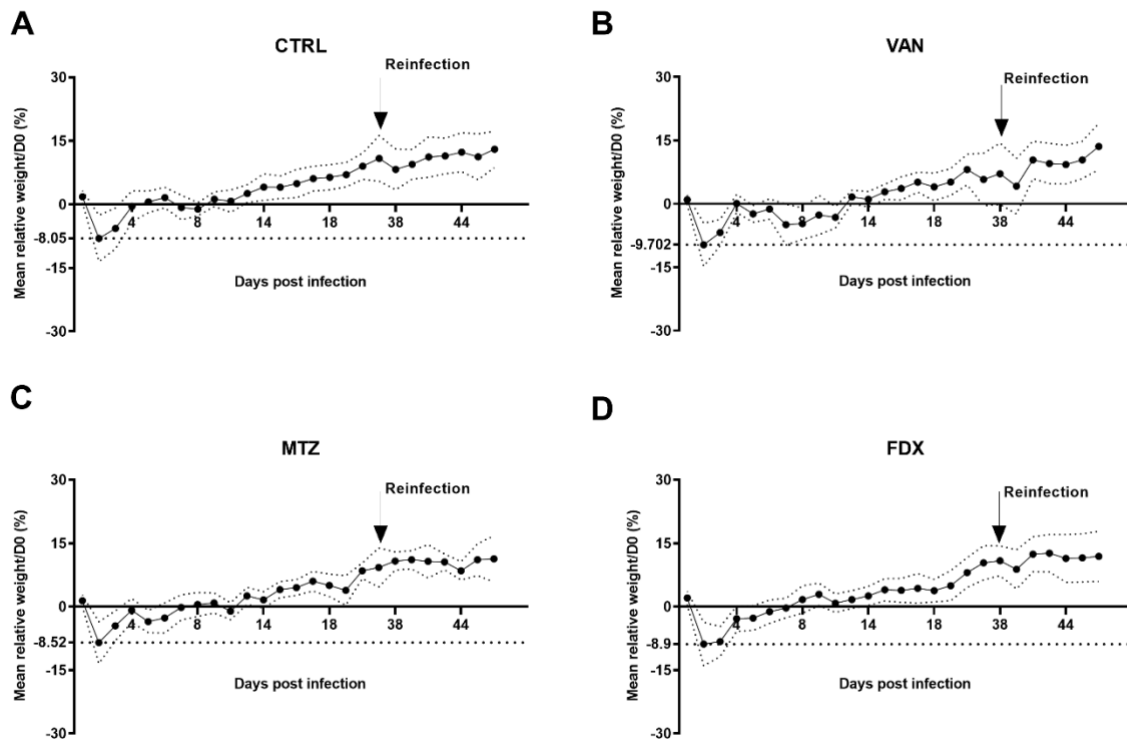


Figure 2: Mean relative weight after infection and re-infection protocol by *C. difficile* (n=8 mice).

A= control infected mice (CTRL); B=vancomycin-exposed mice (VAN); C= metronidazole-exposed mice (MTZ); D = fidaxomicin-exposed mice (FDX). 8 mice per group; infection occurs from day 0 to day 28; re-infection occurs from day 31 to day 51.

Consistent with previous data from our lab, vegetative *C. difficile* cells were detected in fecal samples two days post-challenge to nearly 10^7 CFU/g feces. Subsequently, control infected mice demonstrated a progressive decolonization until the total clearance of detectable vegetative cells of *C. difficile* from day 14 (Figure 3A). After an enrichment step, a few spores were counted between day 14 (2/8 mice) and 28 (3/8 mice) (Table 1, Supplementary data). In contrast, mice exposed to antibiotics, especially vancomycin and fidaxomicin, exhibited a different pattern. On day five, following two days of exposure to these antibiotics, fecal *C. difficile* CFU counts were below the lower limit of quantification (10^3 CFU/g feces) and not detectable without an enrichment step (Figure 3B, 3D). However, by day seven post-challenge, we observed an early recolonization which resulted in a new infection characterized by a new break in the weight curves and diarrhea, in particularly in the vancomycin-exposed mice. Consequently, this extended colonization period in both vancomycin and fidaxomicin groups. We observed a total clearance of detectable vegetative cells of *C. difficile* from day 28 in VAN group and from 21 in FDX group.

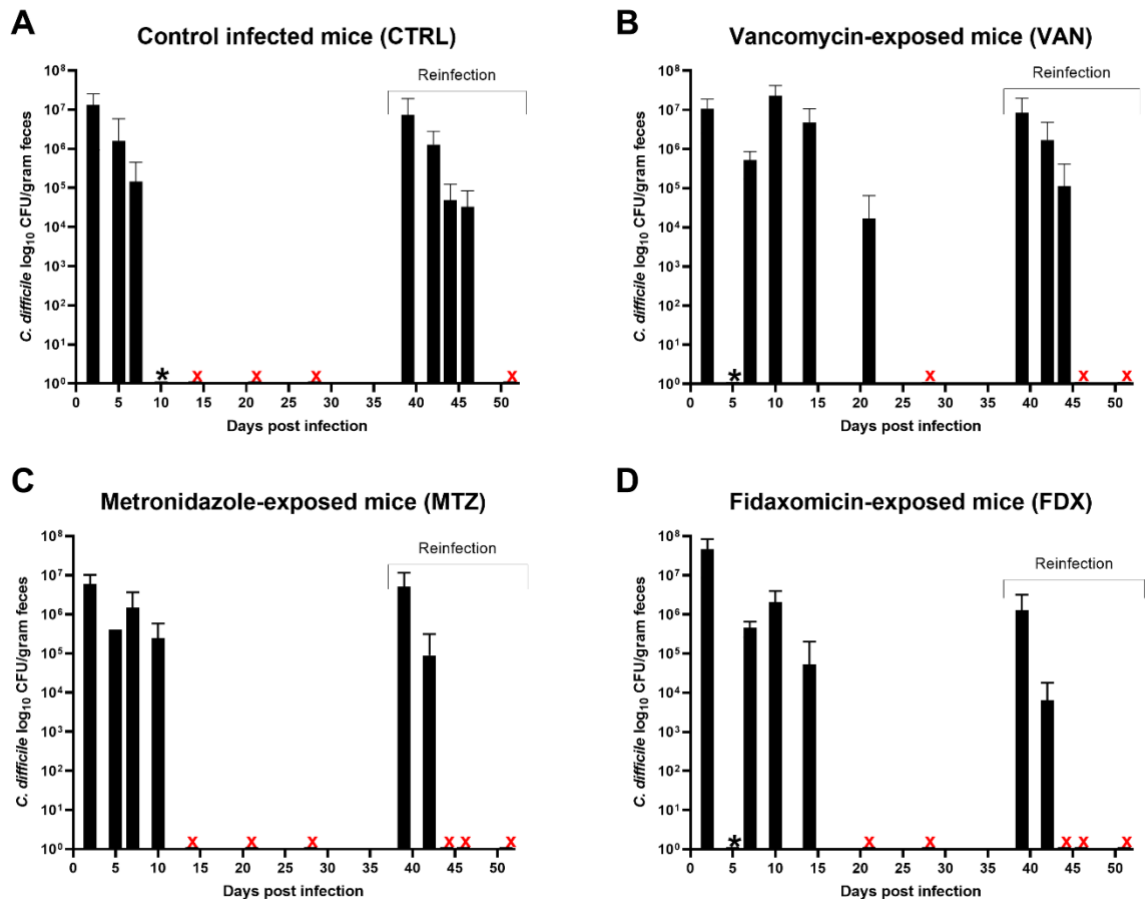


Figure 3: *C. difficile* colonization after infection and reinfection protocol (n=8 mice).

* = *C. difficile* detectable vegetative cells below the limit of detection (10^3 UFC/g feces); x = *C. difficile* vegetative cells not detectable

A= control infected mice (CTRL); B=vancomycin-exposed mice (VAN); C= metronidazole-exposed mice (MTZ); D = fidaxomicin-exposed mice (FDX). Infection occurs from day 0 to day 28.

Reinfection occurs from day 31 to day 51.

In contrast to vancomycin and fidaxomicin, metronidazole had a lesser effect on colonization (Figure 3C). However, on day seven, *C. difficile* CFU counts slightly increased (10-fold) compared to day five followed by a progressive decolonization until the clearance of detectable *C. difficile* vegetative cells from day 14. Notably, no spores were detected on day 28, even after an enrichment step.

By day 28, all mice had successfully cleared all cultivable *C. difficile* vegetative cells. However, few spores were still detected in the control and fidaxomicin groups (3/8 mice) after an enrichment step (Table 1, Supplementary data).

Spores and non-detectable vegetative cells are responsible for early recolonization in VAN and FDX groups

Given the results of vegetative cells counts in vancomycin and fidaxomicin groups, we wanted to determine which form of *C. difficile* was responsible for the early recolonization in these groups. We use DNA extract from four mice fecal samples in vancomycin and fidaxomicin groups to compared by qPCR the quantity of *C. difficile* spores to vegetative cells (Figure 4). On day 2 post-infection, we observed a higher quantity of vegetative cells compare to spores.

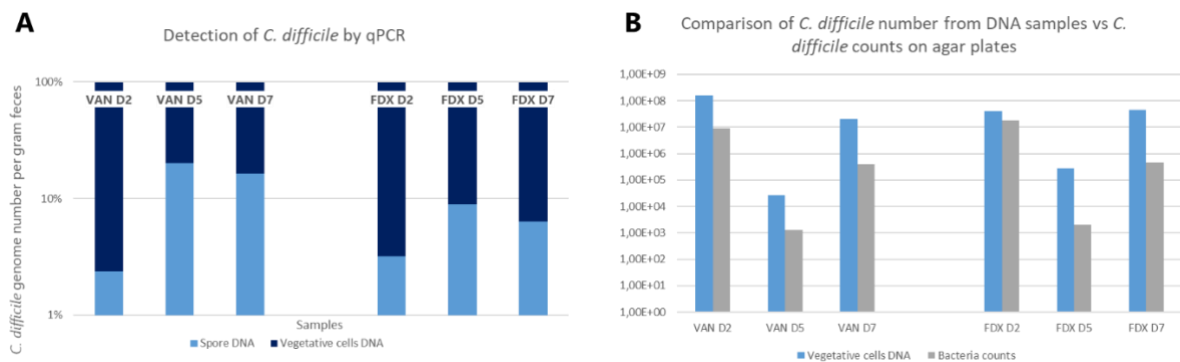


Figure 4: Detection of *C. difficile* by qPCR.

A) Comparison of mean *C. difficile* spores and vegetative cells in bacterial total DNA. B) Comparison of mean *C. difficile* vegetative cells from DNA extract (in *C. difficile* genome number/g feces in blue) and counts on agar plates (in UFC/g feces in gray). DNA was extracted from four mice fecal samples from vancomycin (VAN) and fidaxomicin (FDX) groups.

However, by day 5, after two consecutive days of antibiotics exposure, the quantity of spores increased in both vancomycin and fidaxomicin groups, with higher number in vancomycin group (Figure 4A). When we compare *C. difficile* number in total DNA extraction to *C. difficile* counts on agar plates, we found out that at least 10-fold of *C. difficile* are not cultivable (Figure 4B). Indeed, analysis of DNA samples takes account of viable and non-viable forms of *C. difficile*. These findings suggest that early recolonization observed on day 7 was likely induced by *C. difficile* spores and vegetative cells which were not detected on agar plates. Two days of vancomycin and fidaxomicin were unable to completely eradicate all *C. difficile*.

Short antibiotic exposition enhances the adaptive immune response

We next investigated the levels of *C. difficile* native toxin TcdA and TcdB IgG in sera by quantitative ELISA. On day six prior to challenge and on day 21 after the challenge to assess whether antibiotics exposition may increase IgG levels after single induced CDI in mice (Figure 5).

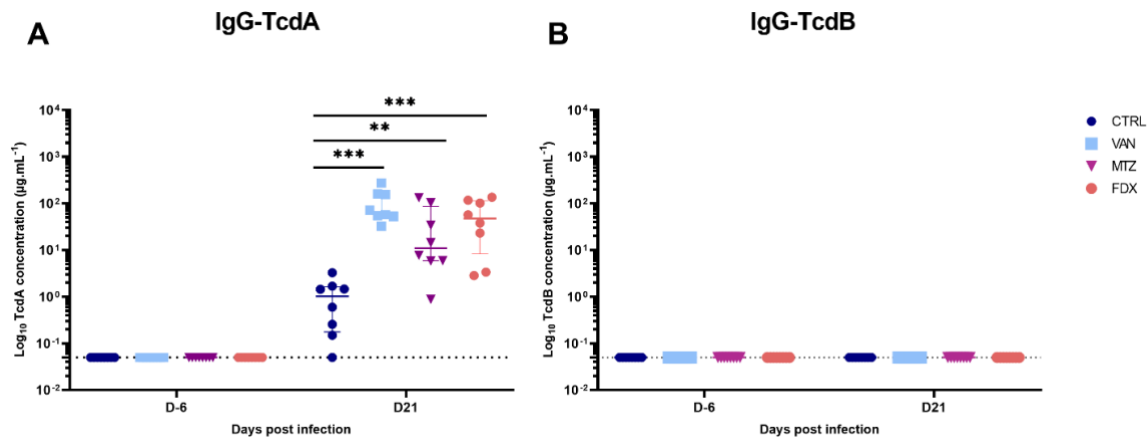


Figure 5: IgG level against *C. difficile* toxins TcdA and TcdB (D-6 vs D21).

CTRL = control infected mice; VAN =vancomycin-exposed mice; MTZ = metronidazole-exposed mice; FDX = fidaxomicin-exposed mice. Infection occurs from day 0 to day 28; reinfection occurs from day 31 to day 51.

** p -value<0.001; *** p -value<0.0001

As expected, no detectable anti-toxins IgG were present in sera collected on day six before the challenge, thus serving as a baseline for antibody detection.

Groups comparisons revealed that the mean IgG anti-TcdA levels in the antibiotics-exposed group was significantly elevated in comparison to the control group on day 21. Especially, IgG anti-TcdA levels were homogenous and significantly higher in vancomycin-exposed mice compared to the control mice (Figure 5A). In fidaxomicin, and metronidazole-exposed mice anti-TcdA IgG levels were also significantly higher compared to the control mice although the display some variability in comparison to the vancomycin-exposed mice (Figure 5A). Interestingly, anti-TcdB IgG was not detectable in sera at day 21 despite the exposure to antibiotics (Figure 5B).

Single reinfection impacts IgG level in mice

We then assessed the impact of single reinfection on the digestive colonization by *C. difficile* and on the adaptive immune response. Mice, previously exposed to antibiotics (VAN, MTZ, and FDX groups) as well as control infected mice (CTRL group), were infected again on day 37 after the first infection according to infection protocol. We observed a less pronounced weight loss and mild diarrhea compared to the first infection (Figure 2). Whereas free toxins were detected in a fecal sample of mice from CTRL and VAN groups using a toxin detection kit. Remarkably, certain groups (FDX, and MTZ) exhibited a rapid clearance of *C. difficile* compared to the first

infection (Figure 3C and 3D). These findings suggest that the antibodies produced in response to the first infection confer protection against subsequent infection by *C. difficile*. All mice had clear *C. difficile* colonization and spores were not detected in any of the groups after the enrichment step using a cecal content collected at the endpoint (Table 1, Supplementary data). Following the second challenge for antibiotics-exposed mice and control infected mice, anti-TcdA IgG levels significantly increased for about 10-fold compared to day 21. Notably, these levels appeared to be comparable between all groups (Figure 6A), reaching a concentration level of 10^3 $\mu\text{g/mL}$.

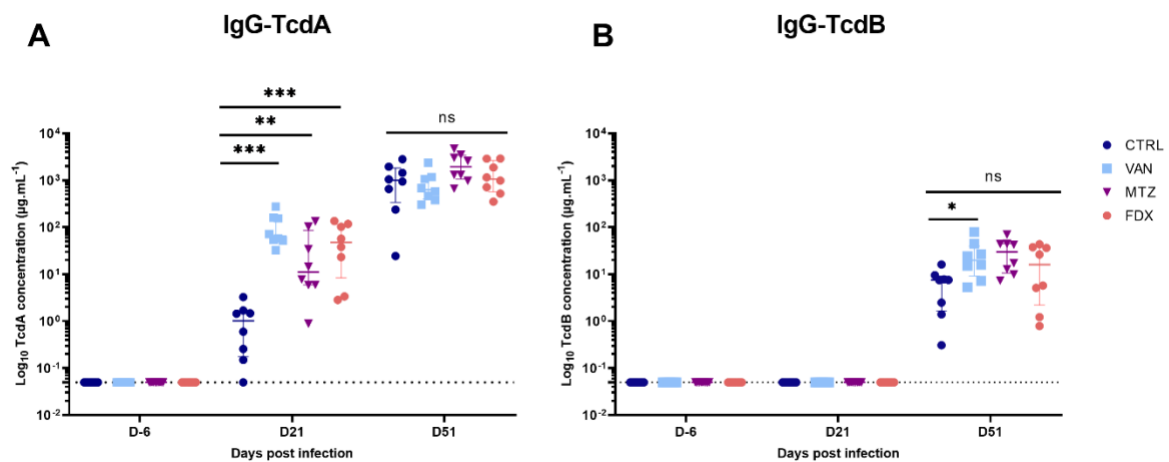


Figure 6: IgG levels against *C. difficile* toxins TcdA and TcdB in CTRL, VAN, MTZ, and FDX groups. CTRL = control infected mice; VAN =vancomycin-exposed mice; MTZ = metronidazole-exposed mice; FDX = fidaxomicin-exposed mice. Infection occurs from day 0 to day 28; reinfection occurs from day 31 to day 51.

* p -value <0.05 ; ** p -value <0.001 ; *** p -value <0.0001

After reinfection, we were able to detect anti-TcdB IgG in sera. However, the concentrations were relatively lower compared to those observed for anti-TcdA IgG (Figure 6B).

Cefoxitin induced stress and improve adaptive immune response against *C. difficile* toxins

To determine whether the immune response observed against *C. difficile* toxins can be due to an indirect effect of the disruption of other bacteria of the gut microbiota, thus generating a stress signal likely to increase the response of the host. We exposed mice twice a day for two days after the peak of the infection to cefoxitin (FOX), a broad-spectrum antibiotic that does not target *C. difficile* but affects the gut microbiota. As in the other groups, CDI severity scores peaked on the second day with weight loss attesting CDI. Mice began to regain their initial weight by day four. Similar to metronidazole-exposed mice, cefoxitin-exposed mice exhibited

a slight effect on *C. difficile* colonization. By day seven, *C. difficile* CFU counts showed a slight increase compared to day five, followed by a progressive decolonization until total clearance of cultivable *C. difficile* vegetative cells by day 14 (Figure 7B). Following the reinfection, cefoxitin-exposed mice exhibited a rapid clearance of *C. difficile* compared to the first infection. Likewise, metronidazole, cefoxitin-exposed mice anti-TcdA IgG levels on day 21 were heterogeneous, and significantly elevated compared to the control infected mice (Figure 8A). There was no significant difference between anti-TcdA IgG levels on day 21 in MTZ-exposed mice and in cefoxitin-exposed mice. On day 51 post challenge, anti-TcdA IgG levels were 10-fold higher than D21. Likewise, VAN, MTZ, FDX, and CTRL groups, anti-TcdB IgG was not detected in cefoxitin-exposed mice sera on day 21 but were detectable from D51 in sera (Figure 8B).

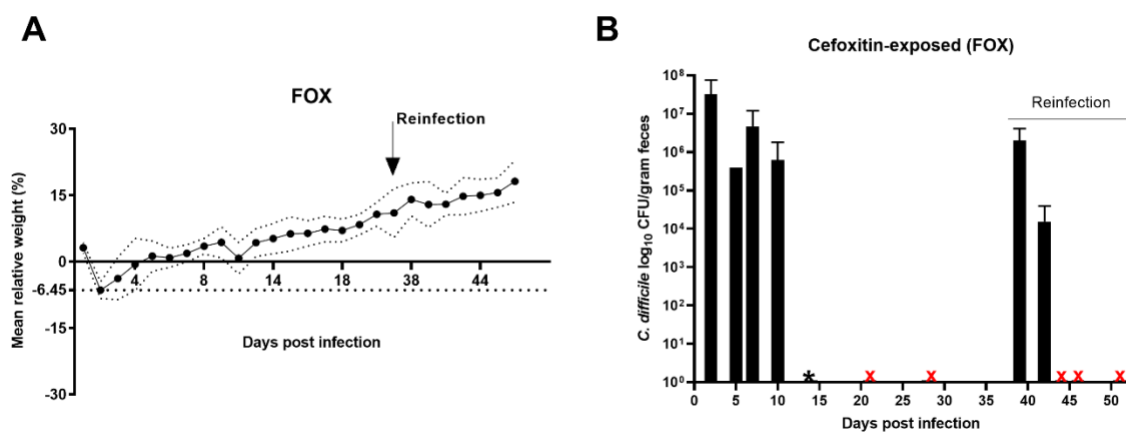


Figure 7: Cefoxitin-exposed mice (FOX).

A) Mean relative weight after infection and reinfection protocol by *C. difficile*. B) *C. difficile* colonization after infection and reinfection protocol

* = *C. difficile* detectable vegetative cells below the limit of detection (10^3 UFC/g feces); x = *C. difficile* vegetative cells not detectable.

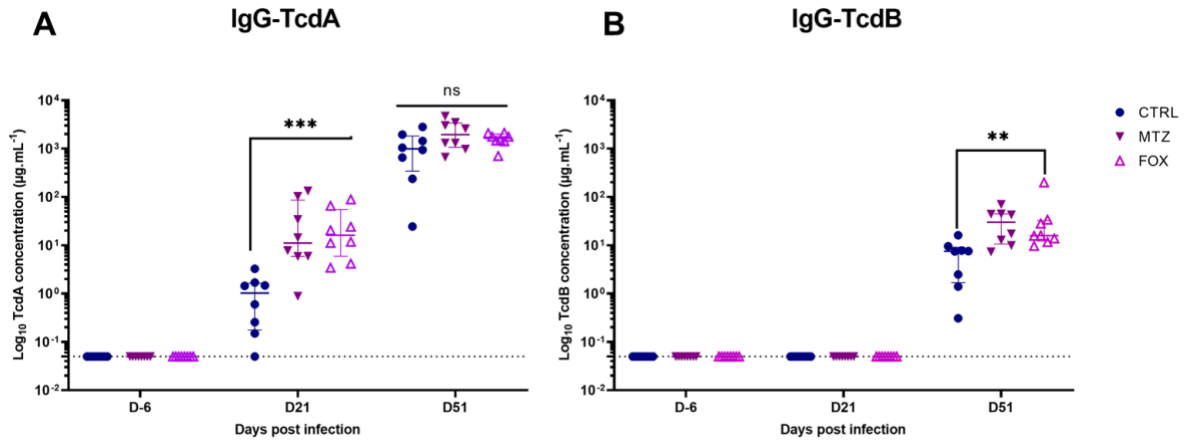


Figure 8: IgG levels against *C. difficile* toxins TcdA and TcdB (MTZ vs FOX vs CTRL).
 ** p -value < 0.001; *** p -value < 0.0001

Multiple (re)infections impact colonization by *C. difficile*

Next, we investigate how multiple reinfections might influence infection profiles and antibody levels. We infected the corresponding group (R) three times on D16, D29, and D37 after a single dose of clindamycin with *C. difficile* following the first challenge. CDI clinical scores peaked on the second day with weight loss and diarrhea for all mice as observed in CTRL, VAN, MTZ, and FDX groups (Figure 9A). After the first infection, we observed a progressive decrease in the bacterial counts until clearance on day 14 (Figure 9B) as observed in the CTRL group. After each re-challenge, mice cleared *C. difficile* more rapidly and weight loss were not observed after the second infection compared to the previous infection (Figure 9A).

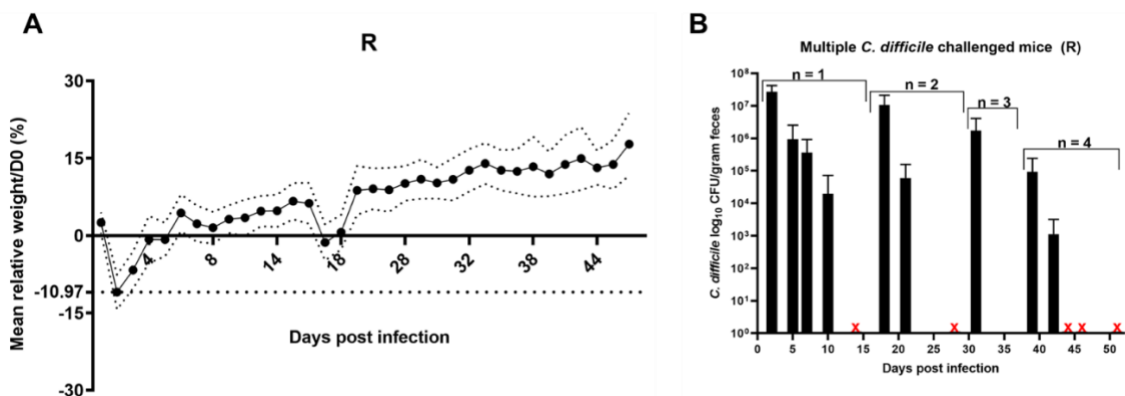


Figure 9: Multiple reinfections in mice (R)

A) Mean relative weight after infection and reinfection protocol by *C. difficile*. **B)** *C. difficile* colonization after infection and reinfection protocol

* = *C. difficile* detectable vegetative cells below the limit of detection (10^3 UFC/g feces); **x** = *C. difficile* vegetative cells not detectable

As observed in antibiotics-exposed groups, on day 21, the anti-TcdA IgG level was 10-fold higher compared to the threshold and significantly elevated compared to the control group (Figure 10A), most likely due to a second contact with *C. difficile* as suggested for the antibiotics-exposed mice. On day 51, after two additional infections for the R group, the anti-TcdA IgG levels reached the same level as those of the CTRL infected mice and those of the antibiotics-exposed mice suggesting a saturation effect in the antibody response, leading to the establishment of anti-TcdA IgG response (Figure 10A).

On day 21, anti-TcdB IgG was detected in some mice. However, there was a significant difference between the CTRL and the R group. On day 51, after multiple reinfections, likewise, the CTRL infected mice, VAN, MTZ, FDX, and FOX exposed mice, anti-TcdB IgG were detectable in sera with no statistically significant difference between CTRL and R groups (Figure 10B).

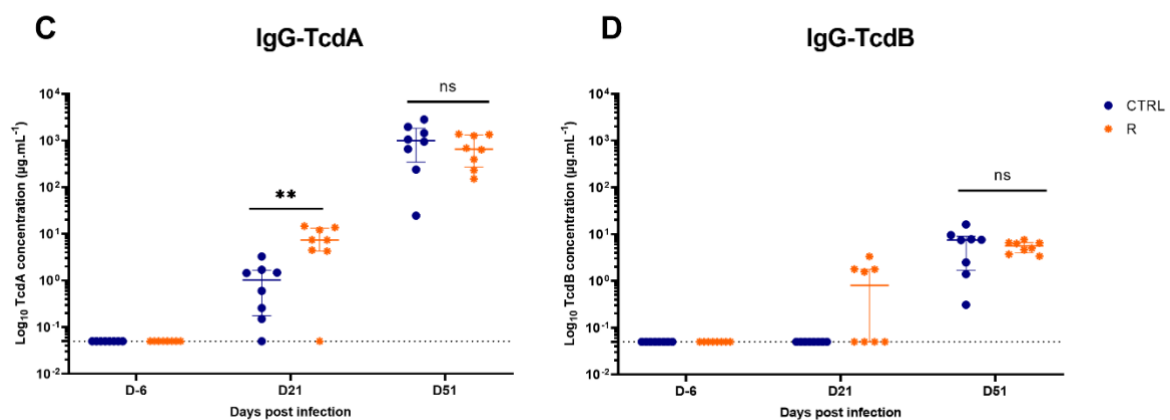


Figure 10: IgG levels against *C. difficile* toxins TcdA and TcdB (CTRL vs R).

** p -value < 0.001

Mucosal IgA response against *C. difficile* toxins are lower compared to IgG level in mice

Lastly, we assessed the levels of anti-TcdA and anti-TcdB IgA in cecal contents collected at the endpoint on day 51 after one or multiple reinfections. Anti-TcdA and anti-TcdB IgA levels were higher but heterogenous in the control group in comparison to the antibiotics-exposed groups (Figure 10). Nevertheless, the anti-toxins IgA response still remained lower in comparison to the IgG level.

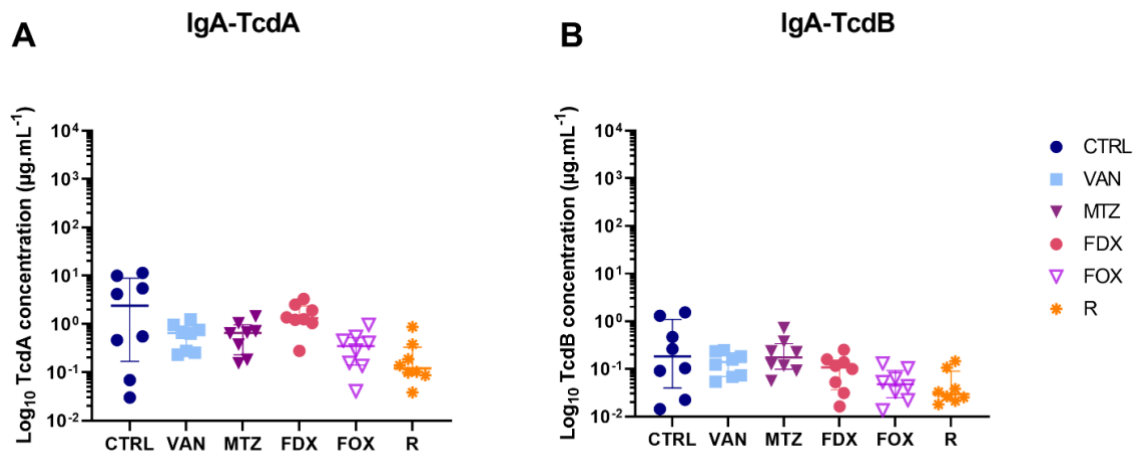


Figure 11: IgA level against *C. difficile* toxins TcdA and TcdB in all groups.

Discussion

In this study, using a mouse model of colonization and infection by *C. difficile*, we have shown that *C. difficile* antibiotics treatment like vancomycin, fidaxomicin, and metronidazole, have impacted both colonization and the modulation of adaptive immune response against *C. difficile* toxins.

In the case of the dynamics of digestive colonization by *C. difficile*, our results indicate a progressive decrease in *C. difficile* colonization until total clearance of cultivable *C. difficile* in the untreated infected group.

The impact of antibiotics on *C. difficile* in this study displayed heterogeneity across the groups. Two days exposure to vancomycin impacted colonization as vegetative forms of *C. difficile* were detected below the lower limit of quantification after exposure. However, some spores and vegetative cells that were undetectable with the culture method still remained, leading to early recolonization associated with clinical symptoms after discontinuation of vancomycin therapy, which is similar to the observations made by Warren *et al.* [23]. Moreover, our study demonstrated that fidaxomicin-exposed mice exhibited the same outcomes to those treated with vancomycin. In our study two days exposure with both vancomycin and fidaxomicin managed the disease, however were ineffective to total clearance of all forms of *C. difficile* and expose mice to relapse. In contrast, metronidazole did not show higher efficacy against *C. difficile* colonization. Indeed, clinical trial in humans, have shown that vancomycin is more effective than metronidazole in treating acute CDI [24]. The failure of metronidazole treatment

does not seem to be associated with resistance but rather a problem of pharmacokinetics, since metronidazole is absorbed early in the digestive tract after its oral administration so that only a small concentration reaches the colon where it should act against *C. difficile* [25–27].

Similarly, to metronidazole, ceftioxin unexpectedly led to a slight decrease in the colonization rate after short exposure. This outcome is surprising, given that ceftioxin is normally not active against *C. difficile*, but does target a broad-spectrum of Gram-positive and Gram-negative aerobic and anaerobic bacteria in the gut microbiota [28].

Overall, our results imply that the antibiotics used induced an additional dysbiosis of the microbiota, leading to the germination of persistent spores and a new colonization process in the colon by *C. difficile*, resulting in early reinfection. This aligns with previous observations in the literature, highlighting that the current CDI therapy, relying on antibiotics active against vegetative cells and spores of *C. difficile*, also contributes to sustaining the microbiota dysbiosis and may increase the risk of relapses in CDI patients [29–31].

Using quantitative ELISA to avoid antibody response saturation, we have demonstrated the influence of antibiotics on the anti-TcdA IgG response. We have shown in antibiotics-exposed mice that early recolonization enhances antibody response compared to the control. This difference between IgG anti-TcdA concentration in antibiotics-exposed mice and the control mice is most likely due to the early recolonization and the extended duration of colonization from day seven.

Unlike most studies in animal models, we added a reinfection protocol, and we demonstrated that second contact or multiple contact with *C. difficile* ameliorates CDI outcomes. Indeed, we observed less and less colonization rate and clinical symptoms with four infections with *C. difficile*. Our results imply that prolonged or repeated exposure to *C. difficile* optimizes the immune response and eventually reaches a steady state. It would be valuable to assess the duration of this over time. However, there was no anti-TcdB response after the first infection, suggesting that a second contact would be necessary to raise IgG against TcdB. Antibiotics appear to enhance the adaptive immune response, particularly in terms of IgG production against *C. difficile* toxins. This suggests that the antibiotics may indirectly impact the host's immune system, potentially contributing to improved clearance of *C. difficile*. Indeed, the adaptive immune response plays an important role in the outcomes of *C. difficile* infection in human [6,32]. It has been demonstrated that low levels of IgG detected against *C. difficile* toxins is associated with CDI recurrence [6,7]. Our results suggest that the antibodies produced during

the initial infection confer a protection against subsequent infections, highlighting the potential significance of the adaptive immune response in preventing CDI recurrence. Likewise, VAN, MTZ, and FDX exposed-mice, FOX-exposed mice showed a higher anti-TcdA IgG levels after the first infection compared to the control infected mice and reached the same IgG levels after reinfection. These findings suggest that the immune response against *C. difficile* seems to be raised with a prolonged disruption of the microbiota by antibiotics that do not target *C. difficile*. It would be valuable to evaluate the modulation of the gut microbiota in this condition. Likewise, to the IgG response, it has been demonstrated that lower levels of mucosal IgA is associated with recurrence [9,13,33]. Our study failed to demonstrate the correlation between CDI evolution and mucosal IgA, we observed a limited IgA response against both *C. difficile* toxins TcdA and TcdB 14 days post-reinfection. Since IgA has a short half-life (4-7 days in humans and other primates) [34], and is rapidly eliminated as it is produced, we have used a sub-optimal sampling window to observe and analyze the IgA mucosal response, suggesting that 14 days after infection might be too late. In the context of *C. difficile* infection, collecting dedicated fecal samples for these mucosal antibodies at an earlier stage would likely yield more indicative results. Although IgG levels are more pronounced, IgA levels, while lower, are still present 14 days after reinfection. It is crucial to note that while mice's immune system provides insights, it is not fully translatable to humans, which represent one of the limitations of using animal models [34].

Our study had however some limitations, we treated mice with vancomycin, metronidazole, and fidaxomicin for only two days instead of five days as reported in multiple studies or ten days if complete treatment of CDI [23,35,36]. Our aim was only to stimulate the infection and a short exposure to demonstrate the divergent outcomes of vancomycin, fidaxomicin, and metronidazole in *C. difficile* infection. We assumed that if we treat CDI early and for 10 days, thereby shortening the host's exposure to *C. difficile*, we may have a suboptimal anti-TcdA and anti-TcdB response. Our results in this mouse model highlight the limitations of antibiotic treatments for CDI, and the necessity for a more detailed understanding of the pathophysiology of CDI to develop strategies with minimal impact on the microbiota, thus reducing recurrence frequency.

Our findings indicate that both fidaxomicin and vancomycin were unable to completely eliminate *C. difficile*, whereas metronidazole has less to no effect on colonization by *C. difficile*. Nevertheless, the persistence of colonization appears to enhance the adaptive immune

response. Ultimately, our findings suggest that antibodies produced during the first infection may neutralize toxins effect and confer protection against subsequent reinfection. In a short-term perspective, we will evaluate the neutralizing potential of antibodies produces in sera (IgG) and cecal contents (IgA) collected in this study.

Furthermore, our results suggest that the host defense against CDI is a multifactorial process that depend not only on the immune response, but also on various factors including the microbiota. Understanding these dynamics is essential for developing more effective treatment strategies and potentially reducing CDI recurrence rates. We will further evaluate the perturbation of the microbiota induced by the short exposure of these antibiotics.

Supplementary data

Table 1: *C. difficile* count after enrichment step in all groups.

Positive after enrichment step	D2	D5	D7	D10	D14	D21	D28	D39	D42	D44	D46	D51
CTRL	ND	ND	ND	7/8	2/8	5/8	3/8	ND	ND	3/8	2/8	0/8
VAN	ND	8/8	ND	ND	ND	6/8	0/8	ND	ND	ND	2/8	0/8
MTZ	ND	8/8	ND	ND	ND	3/8	0/8	ND	ND	1/8	1/8	0/8
FDX	ND	8/8	ND	ND	ND	1/8	3/8	ND	ND	1/8	0/8	0/8
FOX	ND	8/8	ND	ND	ND	1/8	1/8	ND	ND	5/8	1/8	0/8
R	ND	NF	ND	8/8	5/8	NF	2/8	ND	ND	0/8	2/8	0/8

Reference

- [1] Brown KA, Khanafer N, Daneman N, Fisman DN. Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2326–32. <https://doi.org/10.1128/AAC.02176-12>.
- [2] Bartlett JG. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1994;18 Suppl 4:S265–272. https://doi.org/10.1093/clinids/18.supplement_4.s265.
- [3] Garey KW, Sethi S, Yadav Y, DuPont HL. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 2008;70:298–304. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.08.012>.
- [4] Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect* 2009;58:403–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.03.010>.
- [5] Buonomo EL, Petri WA. The microbiota and immune response during *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 2016;41:79–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.009>.
- [6] Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet Lond Engl* 2001;357:189–93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03592-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03592-3).
- [7] Bauer MP, Nibbering PH, Poxton IR, Kuijper EJ, van Dissel JT. Humoral immune response as predictor of recurrence in *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2014;20:1323–8. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12769>.
- [8] Johnson S. Antibody Responses to Clostridial Infection in Humans. *Clin Infect Dis* 1997;25:S173–7. <https://doi.org/10.1086/516220>.
- [9] Johnson S, Gerding DN, Janoff EN. Systemic and Mucosal Antibody Responses to Toxin A in Patients Infected with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 1992;166:1287–94. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.6.1287>.
- [10] Mulligan ME, Miller SD, McFarland LV, Fung HC, Kwok RY. Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 1993;16 Suppl 4:S239–244. https://doi.org/10.1093/clinids/16.supplement_4.s239.
- [11] von Eichel-Streiber A, Paik W, Knight K, Gisch K, Nadjafi K, Decker C, et al. Induction of antitoxin responses in *Clostridium-difficile*-infected patients compared to healthy blood donors. *Anaerobe* 2016;41:91–103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.07.001>.
- [12] Wullt M, Norén T, Ljungh Å, Åkerlund T. IgG Antibody Response to Toxins A and B in Patients with *Clostridium difficile* Infection. *Clin Vaccine Immunol CVI* 2012;19:1552. <https://doi.org/10.1128/CVI.00210-12>.
- [13] Warny M, Vaerman JP, Avesani V, Delmée M. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect Immun* 1994;62:384–9. <https://doi.org/10.1128/iai.62.2.384-389.1994>.
- [14] Markham A. Bezlotoxumab: First Global Approval. *Drugs* 2016;76:1793–8. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0673-1>.
- [15] Wilcox MH, Gerding DN, Poxton IR, Kelly C, Nathan R, Birch T, et al. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* 2017;376:305–17. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602615>.

- [16] Viscidi R, Laughon BE, Yolken R, Bo-Linn P, Moench T, Ryder RW, et al. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis* 1983;148:93–100. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.1.93>.
- [17] Sánchez-Hurtado K, Corretge M, Mutlu E, McIlhagger R, Starr JM, Poxton IR. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *J Med Microbiol* 2008;57:717–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47713-0>.
- [18] Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, Nanthakumar N, Cheknis A, Gerding DN, et al. A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology* 2008;135:1984–92. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>.
- [19] Bruxelle J-F, Mizrahi A, Hoys S, Collignon A, Janoir C, Péchiné S. Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models. *Anaerobe* 2016;37:78–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.010>.
- [20] Elie C, Perret M, Hage H, Sentausa E, Hesketh A, Louis K, et al. Comparison of DNA extraction methods for 16S rRNA gene sequencing in the analysis of the human gut microbiome. *Sci Rep* 2023;13:10279. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33959-6>.
- [21] Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 2004;97:1166–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>.
- [22] Péchiné S, Gleizes A, Janoir C, Gorges-Kergot R, Barc M-C, Delmée M, et al. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 2005;54:193–6. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45800-0>.
- [23] Warren CA, van Opstal EJ, Riggins MS, Li Y, Moore JH, Kolling GL, et al. Vancomycin Treatment's Association with Delayed Intestinal Tissue Injury, Clostridial Overgrowth, and Recurrence of *Clostridium difficile* Infection in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:689–96. <https://doi.org/10.1128/AAC.00877-12>.
- [24] Johnson S, Louie TJ, Gerding DN, Cornely OA, Chasan-Taber S, Fitts D, et al. Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for *Clostridium difficile* infection: results from two multinational, randomized, controlled trials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2014;59:345–54. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu313>.
- [25] Musher DM, Aslam S, Logan N, Nallacheru S, Bhaila I, Borchert F, et al. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2005;40:1586–90. <https://doi.org/10.1086/430311>.
- [26] Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KMLST, Davis MB. A Comparison of Vancomycin and Metronidazole for the Treatment of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea, Stratified by Disease Severity. *Clin Infect Dis* 2007;45:302–7. <https://doi.org/10.1086/519265>.
- [27] Al-Nassir WN, Sethi AK, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Jump RLP, Donskey CJ. Comparison of clinical and microbiological response to treatment of *Clostridium difficile*-associated disease with metronidazole and vancomycin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008;47:56–62. <https://doi.org/10.1086/588293>.
- [28] Nair SR, Cherubin CE. Use of cefoxitin, new cephalosporin-like antibiotic, in the treatment of aerobic and anaerobic infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:866–75. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.6.866>.
- [29] Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, Weiss K, Lentnek A, Golan Y, et al. Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium difficile* Infection. <http://DxDoiOrg/101056/NEJMoa0910812> 2011. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910812>.

- [30] Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, Crook DW, Gorbach SL. Treatment of First Recurrence of *Clostridium difficile* Infection: Fidaxomicin Versus Vancomycin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2012;55:S154–61. <https://doi.org/10.1093/cid/cis462>.
- [31] Allegretti JR, Marcus J, Storm M, Sitko J, Kennedy K, Gerber GK, et al. Clinical Predictors of Recurrence After Primary *Clostridioides difficile* Infection: A Prospective Cohort Study. *Dig Dis Sci* 2020;65:1761–6. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05900-3>.
- [32] Nibbering B, Gerding DN, Kuijper EJ, Zwitter RD, Smits WK. Host Immune Responses to *Clostridioides difficile*: Toxins and Beyond. *Front Microbiol* 2021;12:804949. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.804949>.
- [33] Johal SS, Lambert CP, Hammond J, James PD, Borriello SP, Mahida YR. Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J Clin Pathol* 2004;57:973–9. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015875>.
- [34] van Tetering G, Evers M, Chan C, Stip M, Leusen J. Fc Engineering Strategies to Advance IgA Antibodies as Therapeutic Agents. *Antibodies Basel Switz* 2020;9:70. <https://doi.org/10.3390/antib9040070>.
- [35] van Opstal E, Kolling GL, Moore JH II, Coquery CM, Wade NS, Loo WM, et al. Vancomycin Treatment Alters Humoral Immunity and Intestinal Microbiota in an Aged Mouse Model of *Clostridium difficile* Infection. *J Infect Dis* 2016;214:130–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw071>.
- [36] van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH, Bouza E, Hristea A, Guery B, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 2021;27 Suppl 2:S1–21. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>.

2. Complément de l'article

En utilisant les protéines recombinantes SlpA et FliC purifiées (Annexe 2), nous avons souhaité détecter les anticorps dirigés contre ces deux protéines dans les sérums prélevés à différent temps et dans les eaux fécales préparées à partir des contenus cæcaux prélevés à J51 à l'arrêt de l'essai. Malgré plusieurs tests, nous n'avons pas détecté d'anticorps ni dirigé contre FliC ni contre SlpA (signal en dessous de la limite de détection).

Pour ce qui concerne SlpA, nous avons dans un premier utilisé une purification du précurseur SlpA. Or il a été montré que la sous-unité LMW (*Low Molecular Weight*) de SlpA, représente la sous-unité immunogène de SlpA. Une possibilité serait que la détection soit inefficace avec le précurseur mais possible avec la sous unité LMW. Nous nous sommes donc procuré une solution purifiée de LMW auprès de nos collaboratrices Delphine Sterlin (CHU La Pitié Salpêtrière) et Lise Henaut pour détecter les anticorps dirigés spécifiquement contre cette sous-unité protéique dans les sérums prélevés. Tout comme les premiers essais, nous n'avons pas été en mesure de détecter des anticorps contre SlpA dans les sérums des groupes testés.

Afin de comprendre les déterminants qui font que nous ne sommes pas en mesure d'induire la production des anticorps contre SlpA et FliC dans notre modèle d'infection par *C. difficile* chez la souris, nous avons réalisé des tests ELISPOT « *Enzyme-linked Immunospot* » en collaboration avec Delphine Sterlin. Pour cela, la rate et les plaques de Peyers chez deux souris des groupes contrôle (CTRL), vancomycine (VAN), céfoxitine (FOX) et réinfection multiple (R) à l'arrêt de l'essai à J51 ont été prélevés. Ensuite la présence de cellules B productrices des immunoglobulines dirigées contre FliC et contre la sous-unité LMW de SlpA a été recherchée. Le protocole utilisé est décrit en Annexe 3.

Globalement, nous avons été en mesure de détecter des cellules sécrétrices d'immunoglobulines contre FliC ou contre la sous-unité LMW de SlpA quel que soit le groupe comme le montre la Figure 46E. Cependant, il n'y a pas de différence majeure entre les groupes au niveau des cellules sécrétrices d'immunoglobulines dans les plaques de Peyer dirigées contre FliC (Figure 46A et B). En revanche dans le groupe exposé à la vancomycine, les cellules productrices d'immunoglobulines spécifiques dirigées contre la sous-unité LMW de SlpA ne semblent pas détectables. En outre, dans la rate, il a été possible de détecter les anticorps totaux mais pas les anticorps spécifiques dirigés contre FliC ou la sous-unité LMW de SlpA (Figure 46C, et D).

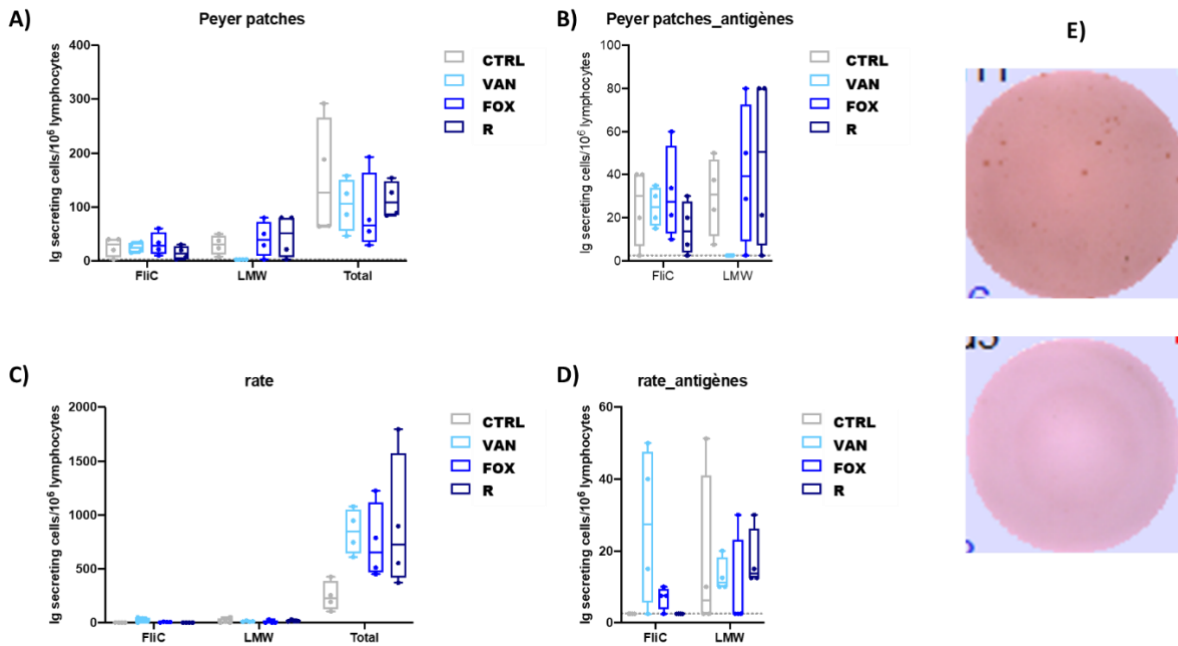


Figure 46 : Cellules productrices d'immunoglobulines contre la flagelline FliC, la sous-unité LMW de SlpA et d'immunoglobulines totales dans les plaques de Peyer et dans la rate.

Le test ELISPOT a été réalisé sur deux échantillons de souris des groupes CTRL (contrôle), VAN (vancomycine), FOX (céfoxitine) et R (réinfection multiple).

A) Cellules sécrétrices d'Ig anti FliC et anti-LMW de SlpA et d'Ig totales dans les plaques de Peyers ; **B)** zoom sur les cellules sécrétrices d'Ig anti FliC et anti-LMW de SlpA dans les plaques de Peyers ; **C)** Cellules sécrétrices d'Ig anti FliC et anti-LMW de SlpA et d'Ig totales dans la rate ; **D)** zoom sur les cellules sécrétrices d'Ig anti FliC et anti-LMW de SlpA dans la rate ; **E)** Images des puits contenant les spots

Ces résultats suggèrent qu'il y a probablement une différence entre les cellules B spécifiques et les cellules B totales. D'autre part, l'absence de production d'anticorps spécifiques contre FliC et la sous-unité LMW de SlpA dans la rate serait potentiellement à l'origine de l'absence de détection d'anticorps contre ces facteurs dans les sérums.

D. Chapitre II partie B : Impact de différents antibiotiques sur la modulation du microbiote digestif en réponse à l'infection par *Clostridioides difficile*

(Résultats non publiés)

1. Contexte

La première partie des objectifs principaux de cette thèse visait à évaluer l'impact de la vancomycine, du métronidazole, de la fidaxomicine de même que celui de la céfoxitine sur la dynamique de la colonisation digestive par *C. difficile*. Les résultats décrits dans la partie A, montrent que deux jours d'exposition à la vancomycine et à la fidaxomicine ont conduit à une décolonisation rapide des formes végétatives suivie d'une recolonisation précoce après l'arrêt du traitement et par conséquent une prolongation de la colonisation dans le temps. Les résultats obtenus avec la vancomycine et la fidaxomicine suggèrent qu'une brève exposition à ces deux antibiotiques a induit une dysbiose additionnelle du microbiote intestinal, favorisant ainsi la germination des formes sporulées qui auraient contribué à une recolonisation digestive associée à des symptômes cliniques. En plus des formes sporulées, la recolonisation probablement était possible à partir des formes végétatives non cultivables sur nos milieux gélosés. Contrairement à la vancomycine et à la fidaxomicine, le métronidazole a eu moins d'effet sur le taux de colonisation digestive et a présenté un comportement similaire au groupe contrôle pour lequel il a été observé une décolonisation progressive jusqu'à la clairance de toutes formes cultivables de *C. difficile*.

Dans cette deuxième partie, nous avons initié l'analyse du microbiote intestinal par le séquençage de l'ADNr 16S. Notre premier objectif a été d'évaluer les perturbations induites par la vancomycine, la fidaxomicine de même que celles induites par le métronidazole après l'infection et après 2 jours d'exposition afin de mieux comprendre leur impact sur le microbiote intestinal en comparaison du groupe contrôle. Nous avons examiné la dynamique du microbiote pendant l'infection et la réinfection par *C. difficile*. Nous avons également évalué le profil du microbiote après la réinfection multiple par rapport à une simple réinfection, en comparant le groupe contrôle au groupe réinfection multiple (R).

2. Matériels et méthodes

a) Extraction de l'ADN génomique total

L'extraction de l'ADN génomique total a été réalisée pour 196 échantillons au total (Annexe 5) L'extraction a été effectuée pour quatre souris par groupe pour des prélèvements effectués les jours -6, 0, 2, 5, 7, 14, 28, 37, 39 et 51 (Figure 47) dans les groupes de souris infectées et exposées à la vancomycine, au métronidazole ou à la fidaxomicine, ainsi que dans le groupe contrôle infecté non traité. En ce qui concerne le groupe réinfection multiple l'extraction a été

réalisée seulement pour trois souris sur des prélèvements correspondant aux jours -6, 0, 2, 5, 7, 14, 18, 28, 31, 37, 39 et 51.

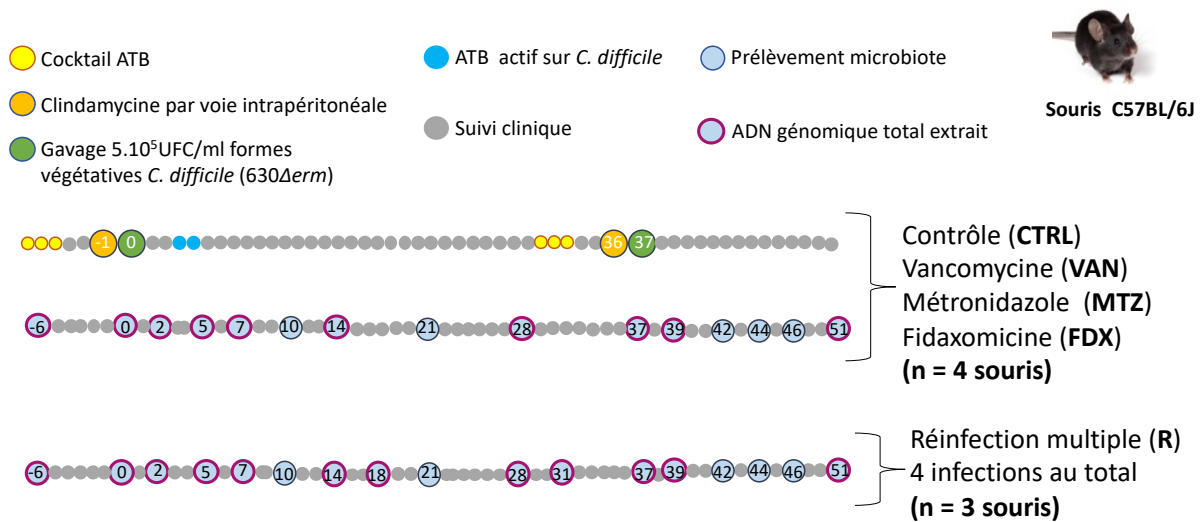


Figure 47 : Protocole infectieux et plan d'échantillonnage pour l'analyse du microbiote.

L'extraction a été réalisée à l'aide du kit d'extraction Qiagen « QIAamp Fast DNA Stool » en réalisant des optimisations inhérentes à nos besoins de pouvoir extraire sélectivement les formes végétatives et les formes sporulées (notamment en ajoutant une étape de lyse mécanique par FastPrep). Le protocole d'extraction utilisé est détaillé dans l'Annexe 4. Ensuite, nous avons déterminé la concentration et la qualité de l'ADN génomique total dans les échantillons par le Nanodrop.

b) Séquençage de l'ADN

20 μ L d'ADN génomique total d'une concentration entre 20-50 ng/ μ L pour chacun des 196 échantillons (Annexe 5) ont été envoyés à la plateforme de séquençage Eurofins pour le séquençage (Illumina Miseq) de la région V3-V4 de l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S).

c) Assemblage des séquences et assignation taxonomique

Les séquences reçues après le séquençage Illumina Miseq ont été traitées à l'aide du pipeline FROGS version 3.2.3 « Find Rapidly Operational Taxonomic Unit (OTU) with Galaxy Solution » (Escudie *et al.*, 2018b). La première étape, utilise l'outil PEAR « Paired-End reAd mergeR » (Zhang *et al.*, 2014). Cette étape vise à assembler les deux lectures générées par l'amplicon en se basant sur la zone de chevauchement entre elles, formant ainsi une séquence d'ADN virtuelle (Figure 48). Les séquences assemblées ont été ensuite soumises à une étape de prétraitement (« Pre-process »), permettant ainsi d'éliminer les erreurs de séquençage et de « nettoyer » les données en vue des étapes ultérieures de l'analyse (suppression des amplicons

en dehors de la taille attendue, suppression des amorces de séquençage, élimination des bases dégénérées N) (Figure 48).

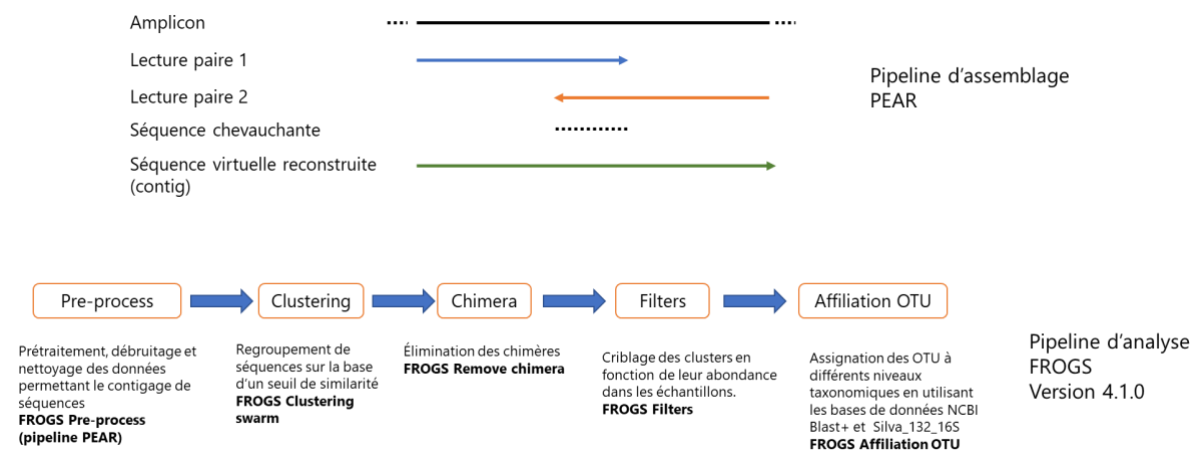


Figure 48 : Les principales étapes de l'analyse bio-informatique du microbiote intestinal.

Ensuite, ces séquences sont regroupées en utilisant la stratégie de clustering SWARM qui permet l'analyse des séquences sans utiliser le seuil classique d'identité des OTU « *Operational Taxonomic Unit* » de 97%. SWARM produit donc des « clusters de séquences » (Mahé *et al.*, 2015). Une fois les séquences regroupées en cluster, elles sont soumises à une étape de détection des chimères (séquences aberrantes). La détection des chimères par FROGS repose sur l'utilisation de l'outil VSEARCH. Enfin, les clusters sont filtrés pour éliminer les clusters artificiels. On ne conserve ainsi que les clusters de séquences qui possèdent au moins 0,05% de l'ensemble des séquences. Enfin les assignations taxonomiques sont réalisées en utilisant la base de données de référence pour l'ADNr 16S bactérien 16S SILVA Pintail100 138.1. Ceci permet d'avoir pour chaque cluster une affiliation aux différents niveaux taxonomiques (du phylum au genre). A ce stade, quand l'affiliation n'est pas possible une liste d'affiliations multiples est générée. Les données de sorties de FROGS correspondent à des matrices de contingences où pour chaque cluster de séquences est indiqués son abondance relative dans chaque échantillon. Les analyses statistiques et les représentations graphiques ont finalement été générées en utilisant des packages R dont « *phyloseq* » et « *phyloseq extend* » dédiés aux analyses de microbiome et l'application graphique Easy16S disponible sur le site : <https://shiny.migale.inrae.fr/app/easy16S>. Cette application permet d'effectuer des analyses statistiques, de visualiser les données et générer des figures. Elle se base également sur du code R et notamment le package « *phyloseq* ». La richesse et la diversité bactérienne ont été mesurées par les indices de mesure de la diversité alpha (mesure indiquant la diversité au sein d'un échantillon) et de la diversité bêta (mesure permettant de corréler la différence et la similarité entre les échantillons). Ces analyses ont été réalisées sur des données normalisées (fonction « *rarefy* »). Pour la diversité alpha, nous avons utilisé les indices de la richesse

observée (reflète le nombre d'espèce dans l'échantillon) et l'indice de Shannon (reflète le nombre d'espèces et leur abondance). Pour la diversité bêta nous avons opté pour les indices de Bray-Curtis et Jaccard.

d) Amplification par PCR

Une PCR a été réalisée afin de détecter la présence de *C. difficile* dans certains échantillons après la réinfection. La PCR a été réalisée à partir de l'ADN génomique total en utilisant le couple d'amorces Cdiff61 (TTGAGCGATTTACTTCGGTAAAGA) et Cdiff197 (CCATCCTGTACTGGCTCACCT) ciblant l'ADNr 16S de *C. difficile* (Rinttilä *et al.*, 2004). La PCR a été effectuée dans un volume final de 25 µL en utilisant un mélange de tampon et de Green Taq Mix (Vazyme, ref : P131-01) avec l'ajout de 2 µL de la matrice d'ADN selon le protocole suivant : une étape de dénaturation initiale de l'ADN à 95°C pendant 5 min, suivi de 35 cycles comportant une dénaturation à 95°C pendant 30 sec, une hybridation à 60°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 30 sec. Enfin, une élongation finale à 72°C pendant 5 min est réalisée. Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose 1% dans le tampon TBE 0,5 X, puis révélés sous lumière sous UV.

3. Résultats

a) Validation de la méthode

Des souris femelles C57BL/6J ont été traitées par un cocktail d'antibiotiques suivi d'une dose de clindamycine administré par voie intrapéritonéale afin d'induire une dysbiose permettant l'implantation de *C. difficile* et le développement de l'infection (protocole adapté de Chen) (Chen *et al.*, 2008). Une validation de la dysbiose induite a été réalisée en comparant le microbiote initial des souris prélevé six jours avant l'administration du cocktail (J-6) au microbiote perturbé, prélevé le jour de l'infection avant le gavage par la souche 630Δ*erm* de *C. difficile* (J0). La Figure 49A montre à J0 une diminution de l'abondance relative des principaux phylums du microbiote à savoir les Firmicutes et les Bacteroidota (anciennement Bacteroidetes) et une augmentation du phylum des Protéobactéries en comparaison du J-6.

Au niveau de la famille, on observe une diminution de l'abondance relative des *Lachnospiraceae*, des *Bacteroidaceae*, des *Muribaculaceae*, des *Oscillospiraceae*, une augmentation des *Enterobacteriaceae* et une apparition des *Sutterellaceae* et des *Tannerellaceae* (Figure 49B). En effet, l'augmentation importante de l'abondance relative de ces *Enterobacteriaceae* représente une caractéristique de la dysbiose induite par les antibiotiques (Reeves *et al.*, 2011; Palleja *et al.*, 2018). Ces résultats montrent bien que nous

avons induit une perturbation du microbiote et par conséquent, nous sommes dans des conditions favorables pour établir la colonisation et l'infection.

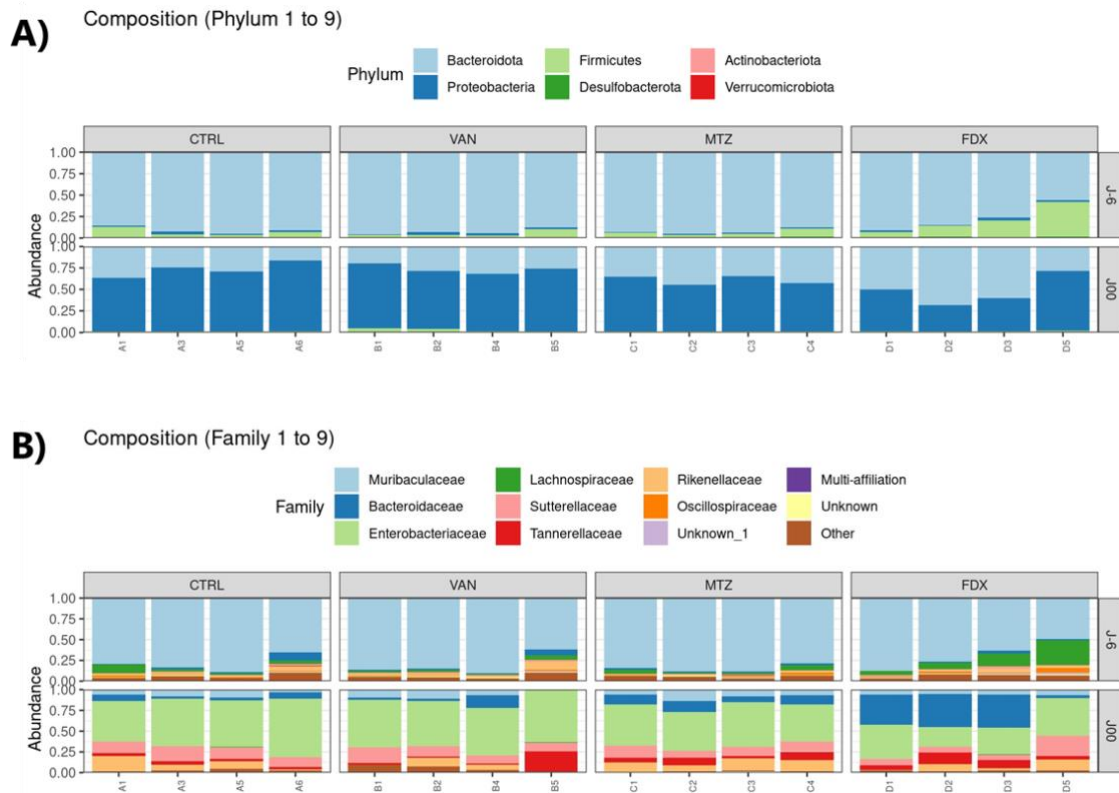


Figure 49 : Représentation de l'abondance relative des phylums majeurs (A) et de quelques familles bactériennes (B) du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX prélevé à J-6 et à J0.

A = groupe contrôle (CTRL) ; B = groupe vancomycine (VAN) ; C = groupe métronidazole (MTZ) ; D = groupe fidaxomicine (FDX). Figure générée avec R studio.

Si on regarde plus en détail le profil du microbiote des souris dans les différents groupes, on observe globalement un profil équivalent avec une petite variabilité entre les groupes notamment chez les souris du groupe FDX (Figure 49). Nous avons montré dans un essai préliminaire de l'analyse du microbiote que les souris ont généralement un profil de microbiote différent lorsqu'elles sont traitées par le cocktail d'antibiotiques en eau de boisson, bien que provenant de la même lignée, du même lot et ayant subi le même protocole (Annexe 1). Ceci pourrait être expliqué par le fait que toutes les souris n'ont pas bu la même quantité d'eau et par conséquent, la même quantité d'antibiotiques. Néanmoins, l'administration de la clindamycine après l'arrêt du cocktail permet d'homogénéiser le profil de dysbiose entre les souris (Annexe 1).

b) Dynamique des *Clostridioides* pendant l'infection et la réinfection de *C. difficile*

Dans le cadre de cette étude, nous avons également examiné le profil des *Clostridioides* tout au long du protocole d'infection et de réinfection obtenu grâce au profilage de l'ADNr 16S que nous avons pu confronter aux données de dénombrement. Comme attendu, au deuxième jour après l'infection, on note la présence des *Clostridioides* qui décroît progressivement jusqu'à son absence à partir de J14 et à J28 (Figure 50).

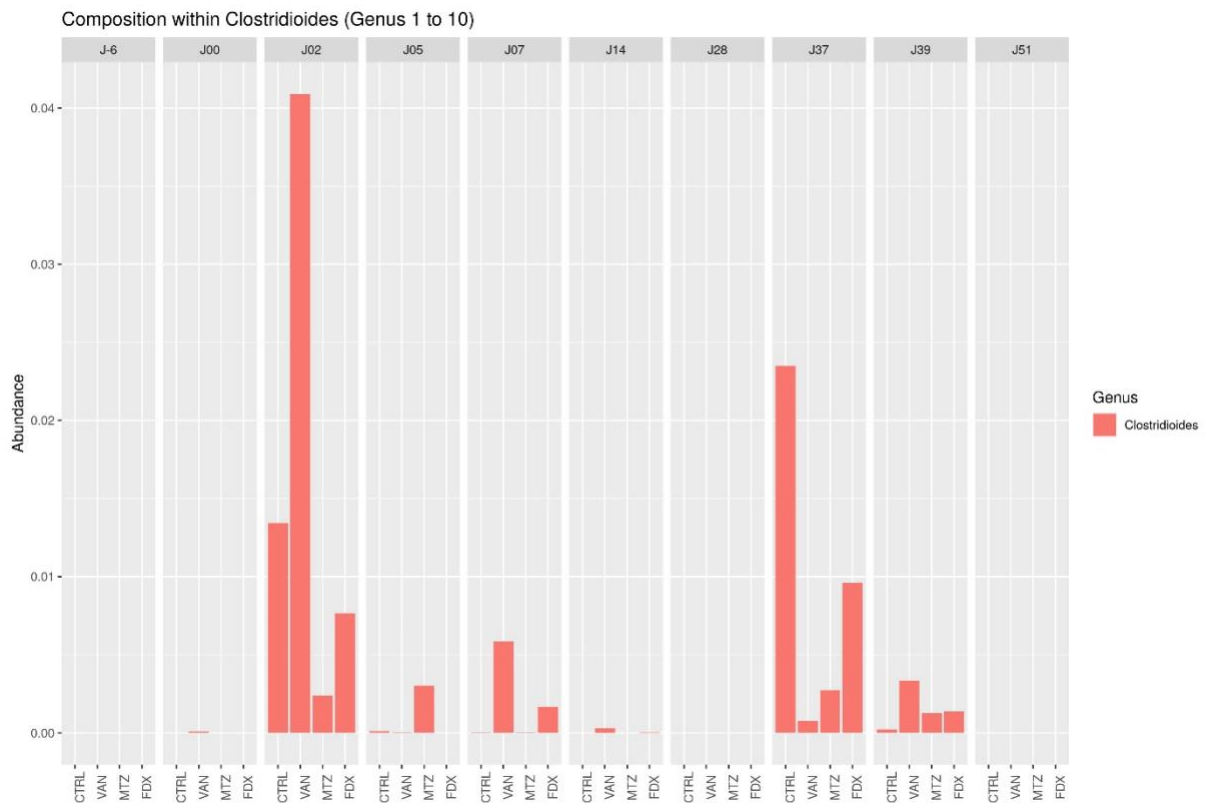


Figure 50 : Représentation de l'abondance relative du genre *Clostridioides* dans les échantillons de 4 souris prélevés à J-6, J0, J2, J5, J7, J14, J28, J37, J39 et J51.

CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à la fidaxomicine. Figure générée par Easy16S.

Au cours de ce protocole infectieux, nous avons introduit une étape de réinfection à partir du J31 avec une dysbiose induite à nouveau par le cocktail d'antibiotiques suivi d'une dose de clindamycine administrée par voie intrapéritonéale la veille du gavage par la souche 630 Δ erm.

De façon surprenante, pendant la réinfection, à J37 (équivalent à J0bis, où les selles des souris ont été prélevés avant le gavage par *C. difficile*), nous avons observé une augmentation de l'abondance relative des *Clostridioides* (Figure 50). Ces données pouvaient suggérer qu'en traitant à nouveau les souris par le cocktail d'antibiotiques suivi de la dose de clindamycine nous avons peut-être induit une rechute.

Au vu de ces résultats, nous avons donc cherché à confirmer cette hypothèse. Pour cela, nous avons réalisé une PCR sur l'ADN génomique total avec des amorces ciblant l'ADNr 16S de *C. difficile* dans les échantillons du groupe contrôle à J28, J37 et à J39. Les résultats de la PCR montrent que à J28, aucun *C. difficile* n'est détectable dans les échantillons (Figure 51).

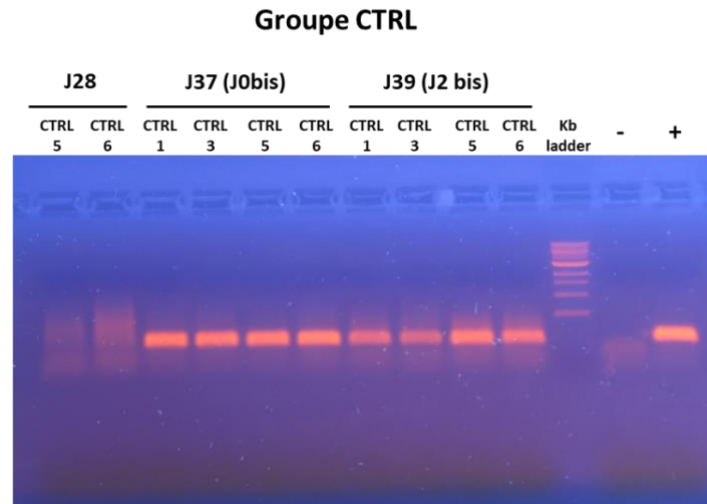


Figure 51 : Détection de *C. difficile* par PCR spécifique sur l'ADN extrait des selles des souris du groupe contrôle à J28, J37 (J0 bis) et J39 (J2 bis).

Le couple d'amorces Cdiff61 et Cdiff197 utilisé ciblant l'ADNr 16S est issu de (Rinttilä *et al.*, 2004). (-) correspond au témoin négatif et (+) correspond au témoin positif.

Ces résultats sont en accord avec les données de la colonisation, où à J28, toutes les souris semblent avoir éliminé *C. difficile*. Cependant, à J37 (J0 bis) et à J39 (J2 bis), *C. difficile* était détectable dans les échantillons. Il est important de noter que les échantillons à J37 ont été prélevés avant le gavage par *C. difficile*. Ces résultats de la PCR confirment que la ré-administration des antibiotiques pour l'induction de la dysbiose dans un modèle de colonisation et d'infection, favorise la rechute. Il semble donc que malgré une négativation de la détection de *C. difficile* dans les selles, il reste des formes de *C. difficile* probablement plus haut dans le tube digestif séquestrées potentiellement sous forme de biofilm et/ou de spores. Ainsi, en infectant les souris avec *C. difficile* à J0bis, nous avons ainsi réalisé une rechute et une réinfection et non une réinfection simple.

c) Comparaison de l'impact des différents antibiotiques de traitements de *C. difficile* sur le microbiote intestinal par rapport au contrôle

Afin de mieux comprendre les perturbations induites par les différents antibiotiques sur le microbiote suite à une brève exposition à la VAN, MTZ et FDX, nous avons comparé le profil du microbiote des différents groupes tout au long du protocole infectieux.

Tout d'abord, nous avons observé la diversité au sein d'un échantillon avec la mesure de la diversité alpha en utilisant l'indice la richesse observée et l'indice de Shannon. On remarque

que les groupes présentent globalement un comportement similaire avant la dysbiose à J-6 et après la dysbiose à J0 avec une diminution de l'indice de diversité alpha entre ces moments. Ceci est vrai pour les deux indices utilisés (Figure 52). Cependant, à partir de J5, la diversité alpha varie entre les groupes exposés aux antibiotiques par rapport aux souris du groupe contrôle.

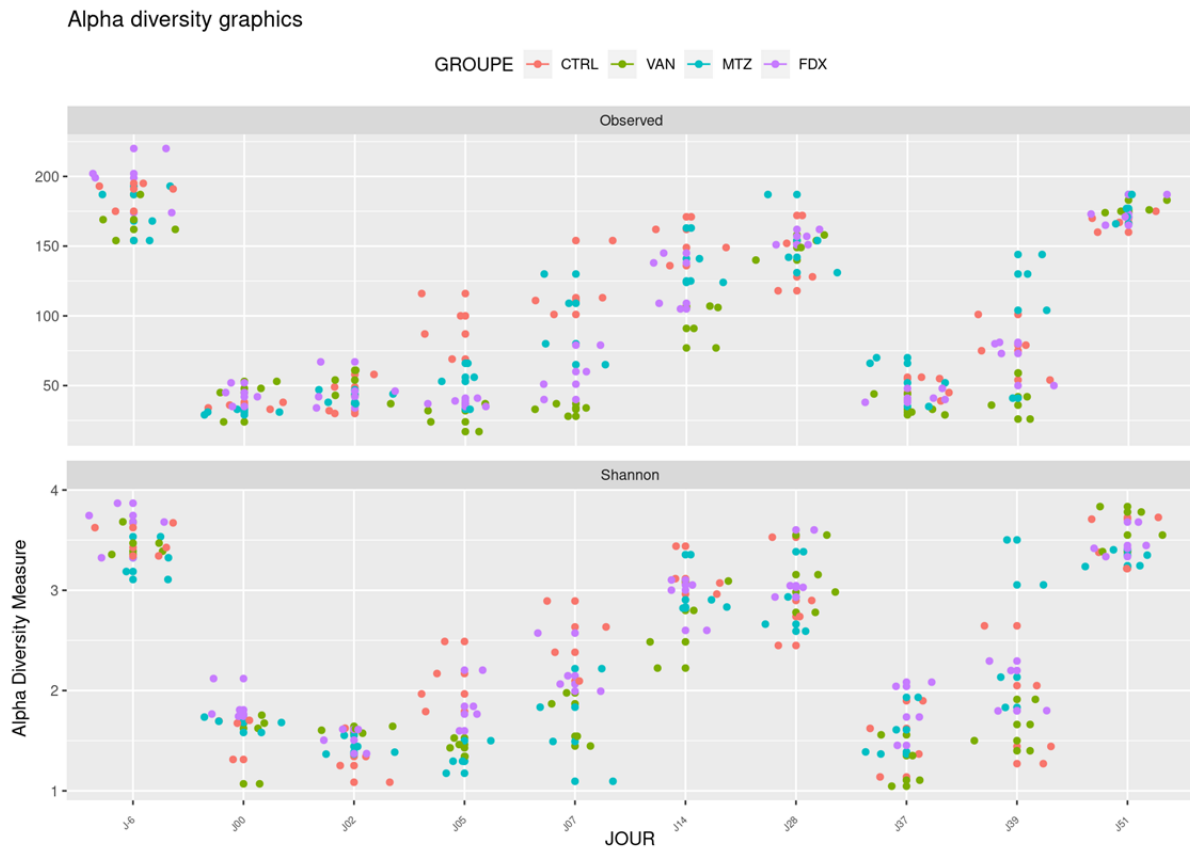


Figure 52 : Représentation de la diversité alpha par la richesse observée et l'indice de Shannon dans les groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX.

Les représentations sont faites sur les données rarifiées. CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à par la fidaxomicine. Nous avons analysé le microbiote de 4 souris provenant de chaque groupe. Figure générée avec R studio.

Dans le groupe contrôle, à partir de J5 post-infection, on observe une augmentation de l'indice de diversité alpha qui tend vers celui de J-6, suggérant un début de résilience du microbiote initial. De même, pour les souris du groupe métronidazole, on recouvre une partie du microbiote initial entre J5 et J14 post-infection (Figure 52). Cependant, dans le groupe vancomycine, les deux indices indiquent une diminution de la diversité à J5 par rapport à J0, suggérant que la vancomycine aurait provoqué une perturbation supplémentaire du microbiote par rapport aux groupes contrôle et métronidazole.

En ce qui concerne le groupe fidaxomicine, il ne semble pas y avoir de différence entre la diversité observée à J0 et celle à J5, suggérant que la fidaxomicine n'a pas aggravé la dysbiose initialement induite en comparaison de la vancomycine. Par ailleurs, on remarque que les groupes présentent globalement un comportement similaire après l'infection à J28. A J37, après le second cocktail d'antibiotiques, on observe une diminution de la diversité alpha dans tous les groupes qui semble remonter plus rapidement vers J-6 par rapport à la première dysbiose.

Nous avons également comparé l'état d'eubiose initial (eubiose 1 à J-6) des animaux à celui après résilience du microbiote après le premier protocole infectieux comprenant ou non un traitement par différents antibiotiques (eubiose 2 à J28) mais aussi après le second protocole infectieux sans l'étape de traitement (eubiose 3 à J51). On observe une légère diminution de la diversité à J28 après l'infection en comparaison du J-6 avant toute manipulation. A J51, à la fin de l'essai, on voit que la diversité semble équivalente entre les groupes et semble se rapprocher de celle du J-6, suggérant une résilience plus rapide par rapport à la première infection. Ces résultats suggèrent un changement substantiel dans la composition du microbiote mais aussi la résilience du microbiote après un processus d'infection et de réinfection.

Ces résultats sont consolidés par la réalisation d'une analyse de variance afin d'évaluer l'influence du groupe, du jour et de l'interaction sur la mesure de la diversité alpha observée (Figure 53).

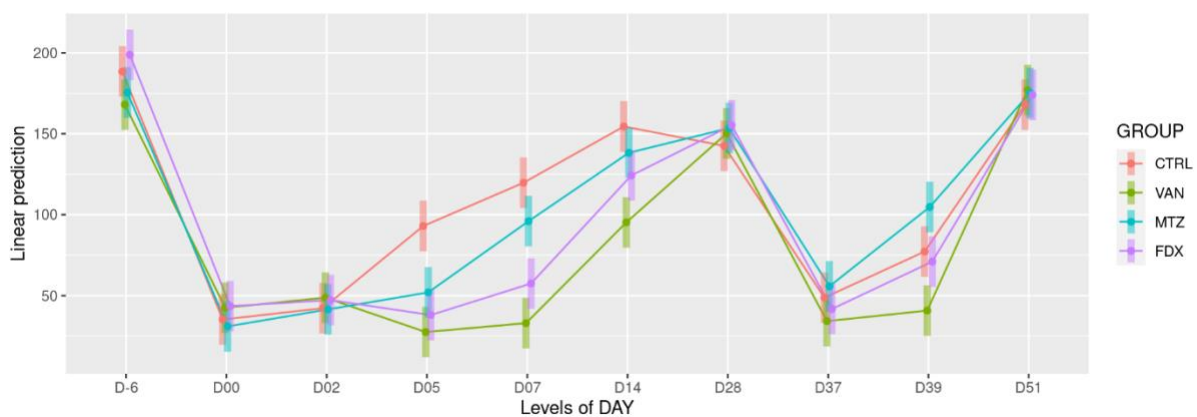


Figure 53 : Représentation de la diversité alpha ajustée par un modèle d'analyse de la variance dans les groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX.

En ordonnée, ce sont les valeurs moyennes de la diversité alpha (ajustées par le modèle d'ANOVA).

Les représentations sont faites sur les données rarifiées. CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à par la fidaxomicine. Nous avons analysé le microbiote de 4 souris provenant de chaque groupe. Figure générée avec R studio.

Les moyennes sont comparées deux à deux et un test de Tukey est appliqué afin de déterminer si elles sont significativement différentes l'une de l'autre. Une différence significative est mise en évidence entre le groupe contrôle et les groupes exposés aux antibiotiques à partir de J5. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les groupes exposés aux antibiotiques d'après le test de Tukey. Par ailleurs, à J28 tous les groupes présentent de nouveau un profil équivalent (Figure 53). On observe une diminution de la diversité alpha équivalente pour tous les groupes à J37, après la seconde administration du cocktail d'antibiotiques. De façon intéressante, il n'y a pas de différence significative entre les groupes à J37 et à J51 (fin de l'essai) d'après le test de Tukey.

En concordance avec la diversité alpha, la diversité bêta a été fortement impactée par le cocktail d'antibiotiques suivi de la dose de clindamycine à J0 par rapport à J-6 (Figure 54). De plus, les échantillons sont regroupés en fonction du jour et du groupe. Les souris exposées au métronidazole, ainsi que celles du groupe fidaxomicine sont plus proches de celles du groupe contrôle à J5 en utilisant l'indice de Bray-Curtis. Cependant, comme observé avec l'alpha diversité, les souris exposées à la vancomycine semblent avoir un profil qui se détache à J5 par rapport aux autres groupes (Figure 54).

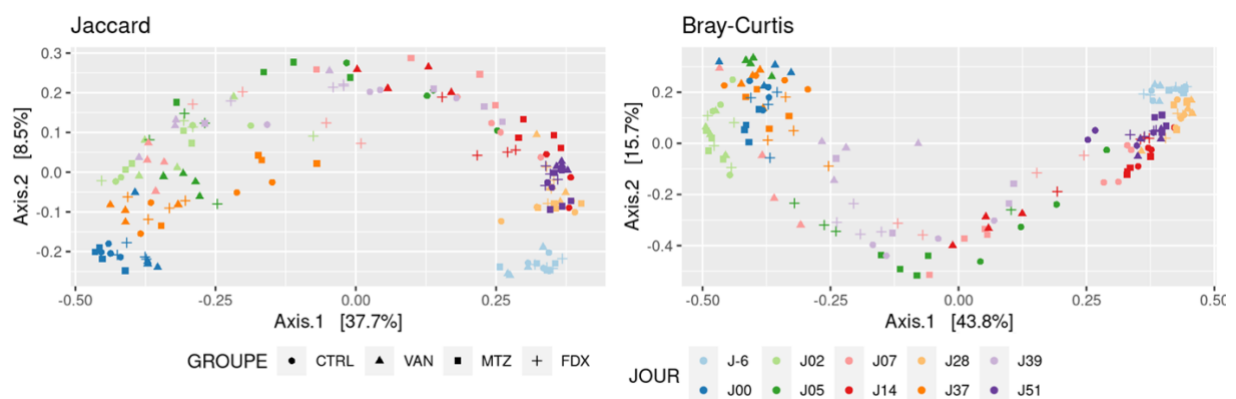


Figure 54 : Représentation MDS « *Multidimensional Scaling* » avec les mesures de la diversité bêta Jaccard et Bray-Curtis.

Les représentations sont faites sur les données rarifiées. CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à par la fidaxomicine. Figure générée avec R studio.

Les mesures d'alpha et bêta de la diversité montrent que les antibiotiques ont un impact diversifié sur le microbiote intestinal des souris. Par ailleurs, on voit que les échantillons du J28 et J51 se regroupent et semblent plus proches, cependant ils semblent distants du J-6.

En termes de phylum, après l'infection, on observe la poursuite de la dysbiose avec la perte des Firmicutes et des Bacteroidetes et l'augmentation importante de la part des Protéobactéries qui se maintient jusqu'au deuxième jour post-infection (J2) dans tous les groupes (Figure 55).

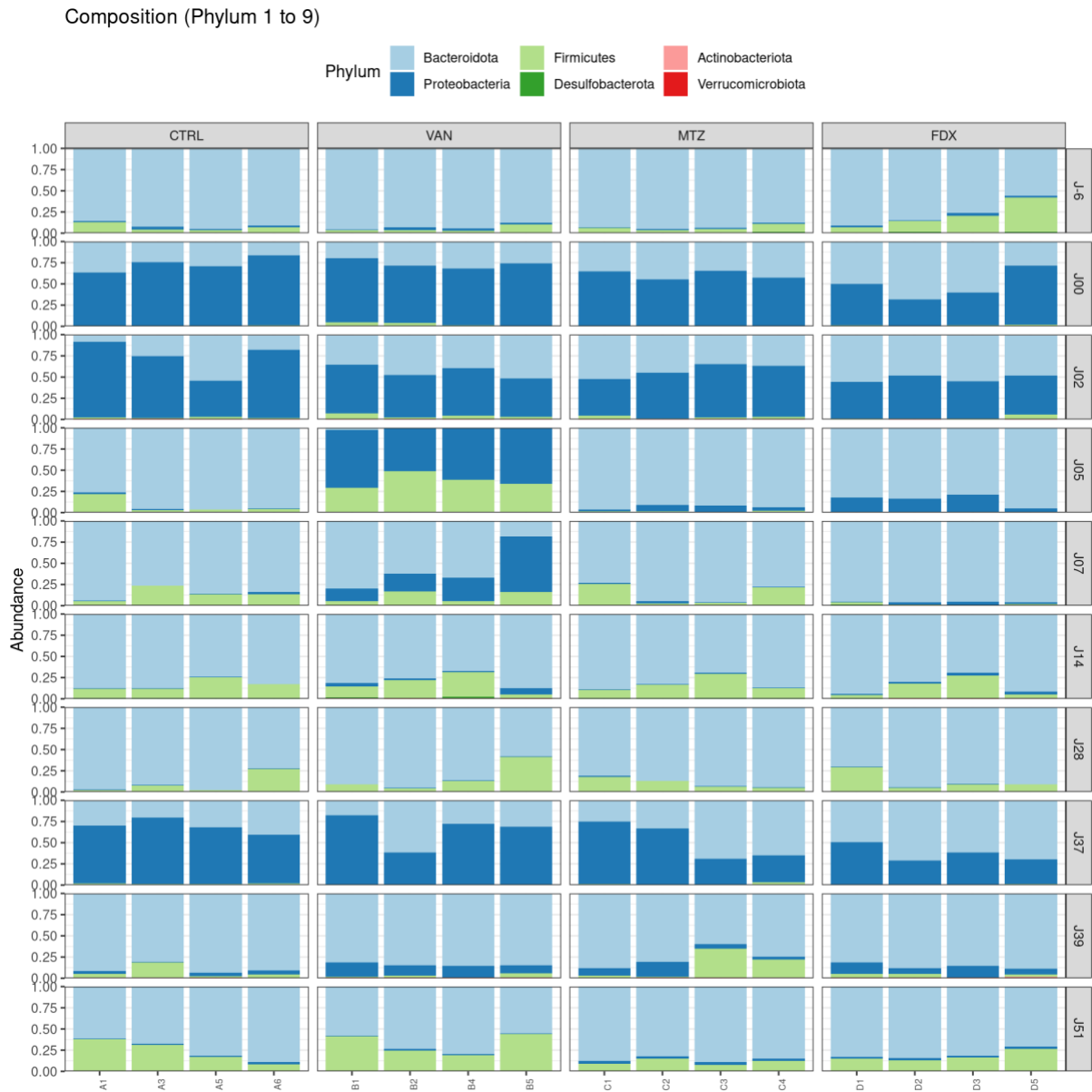


Figure 55 : Représentation de l'abondance relative des phylums du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.
A = groupe contrôle infecté non traité (CTRL) ; B = groupe infecté et exposé à la vancomycine (VAN) ; C = groupe infecté et exposé au métronidazole (MTZ) ; D = groupe infecté et exposé à la fidaxomicine (FDX). Figure générée avec R studio.

Cette dysbiose persiste jusqu'à J5 et même à J7 post-infection chez les souris exposées à la vancomycine. Cependant, pour les autres groupes (CTRL, MTZ et FDX), on retrouve à un profil comparable à celui observé à J-6 avant la dysbiose. La différence entre les groupes se situe donc entre le J5 et le J7. Ces données pour la vancomycine et la fidaxomicine semblent être cohérentes avec la littérature où suite au traitement par la vancomycine, on observe une dysbiose plus importante en comparaison de celle induite par la fidaxomicine (Louie *et al.*, 2011; Cornely *et al.*, 2012; Louie *et al.*, 2012). A J28 post-infection, on observe un profil proche du J-6 équivalent pour tous les groupes avec la perte des Protéobactéries (Figure 55). Une analyse différentielle devra nous permettre de préciser les différences observées entre les groupes (analyse en cours).

Après la seconde administration du cocktail d'antibiotiques et de la dose de clindamycine, à J37 (J0bis), on retrouve en termes de phylum le profil équivalent à la première infection et pour tous les groupes. Et à J39 post-infection correspondant au deuxième jour post-réinfection, le retour au profil initial avant la dysbiose semble avoir été plus rapide en comparaison de la première infection (Figure 55).

Au niveau de la famille, on observe un profil varié dans le groupe exposé à la vancomycine avec la persistance des *Enterobacteriaceae* déjà observée avec la dysbiose primaire (Figure 56). De plus, on observe l'apparition de certaines familles qui n'ont pas pu être identifiées. Suite à l'exposition à la fidaxomicine et au métronidazole, on observe l'augmentation de l'abondance relative des *Bacteroidaceae* (phylum Bacteroidetes) à J5 post-infection comparativement à la vancomycine qui semble au contraire diminuer. D'autre part, dans le groupe contrôle, on observe une augmentation des *Muribaculaceae* et l'apparition des *Lachnospiraceae* qui semble variable au sein du groupe. A partir de J14 post-infection, on peut observer un profil équivalent parmi les groupes avec l'abondance des *Lachnospiraceae*, des *Bacteroidaceae* et des *Muribaculaceae* (Figure 56). A J51 post-réinfection, on observe un profil équivalent parmi les groupes avec l'abondance relative des *Lachnospiraceae* et des *Muribaculaceae* plus importante que celles observées à J28 post-infection.

Composition (Family 1 to 9)

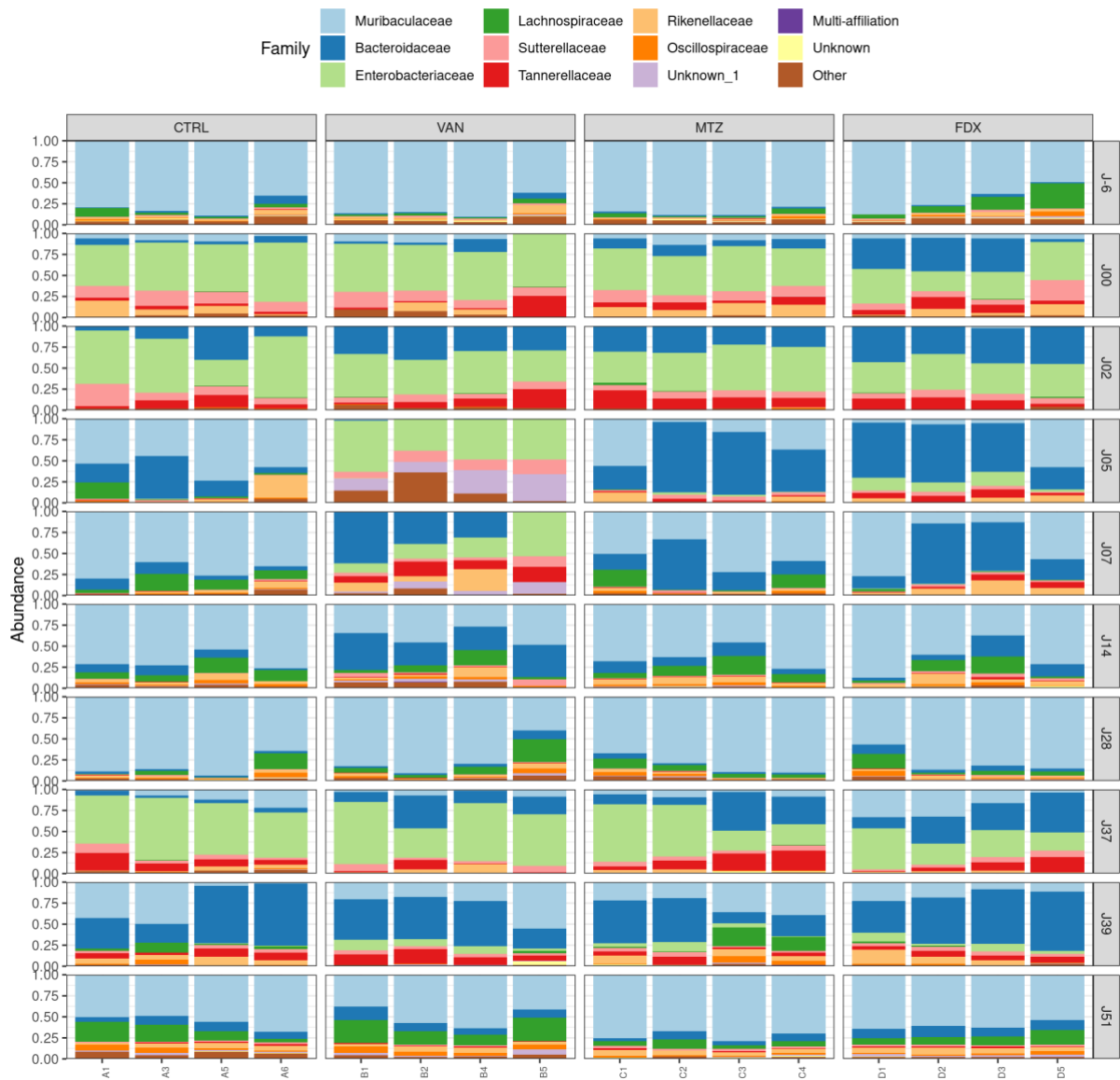


Figure 56 : Représentation de l'abondance relative des familles majeures du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.

A = groupe contrôle infecté non traité (CTRL) ; B = groupe infecté et exposé à la vancomycine (VAN) ; C = groupe infecté et exposé au métronidazole (MTZ) ; D = groupe infecté et exposé à la fidaxomicine (FDX). Figure générée avec R studio.

Au vu de la variation des profils au niveau de la famille, nous avons réalisé une analyse préliminaire en sélectionnant quelques exemples de genres qui nous semblaient intéressants à étudier et pour lesquels il semble y avoir des différences entre les groupes.

En faisant un zoom sur les *Enterobacteriaceae*, en particulier les *Escherichia-Shigella*, à J5 et même à J7, dans le groupe vancomycine, on observe leur persistance en comparaison du groupe contrôle et du groupe métronidazole, où ils sont quasiment absents comparativement

à J0 (Figure 57). En revanche, chez les souris exposées à la fidaxomicine, à J5 l'abondance relative des *Escherichia-Shigella* reste faible. A J14 et à J28 post-infection, on observe un profil proche du J-6 équivalent pour tous les groupes avec la perte des *Escherichia-Shigella* qui réapparaissent à J37 avec la dysbiose induite par la seconde administration du cocktail d'antibiotiques.

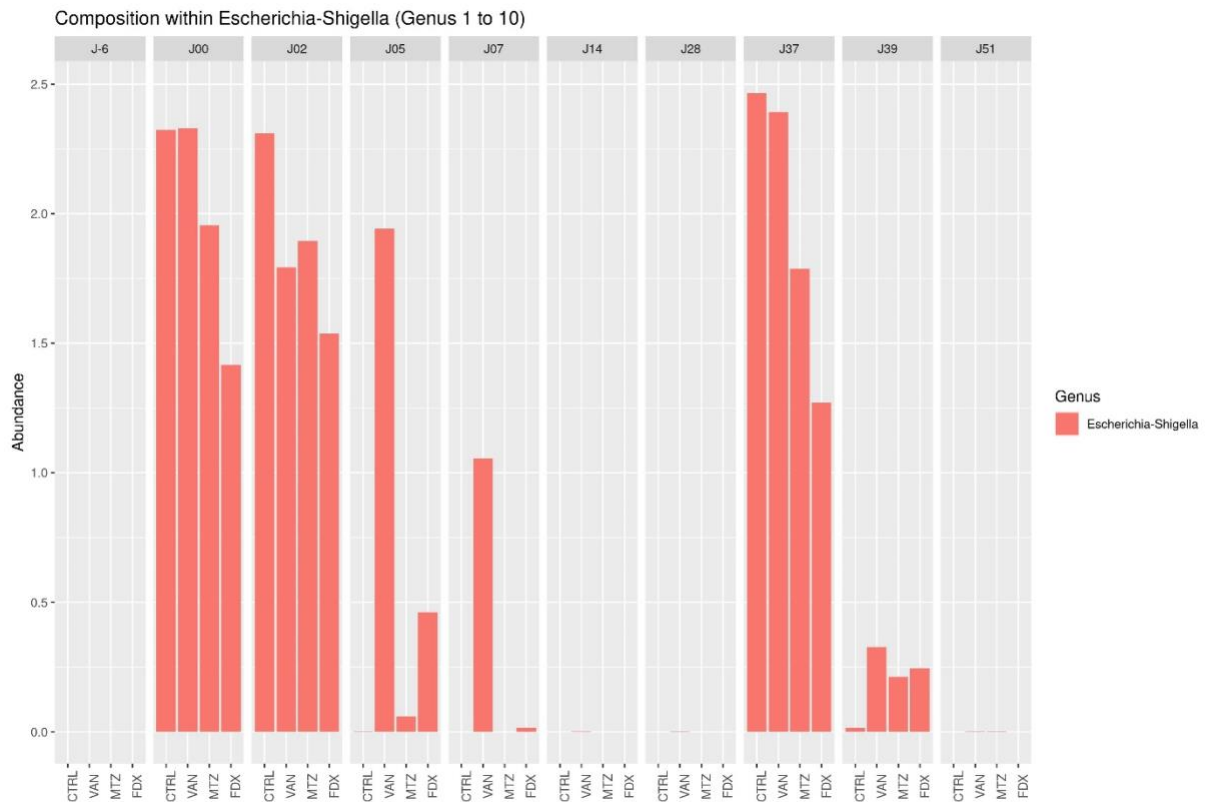


Figure 57 : Représentation de l'abondance relative des *Escherichia-Shigella* dans les échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.

CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à la fidaxomicine. Figure générée par Easy16S.

En revanche, le genre *Blautia* de la famille des *Lachnospiraceae* qui était présent en faible abondance relative, disparaît après l'administration du cocktail d'antibiotiques et par la dose de clindamycine dans les échantillons prélevés à J0 (Figure 58). A J5, en comparaison des souris du groupe contrôle où le genre *Blautia* réapparaît, il est absent dans les groupes exposés à la vancomycine, le métronidazole et la fidaxomicine. Cette perte des *Blautia* est maintenue jusqu'à J7 dans les groupes vancomycine et fidaxomicine. De même, après la seconde administration du cocktail d'antibiotiques, *Blautia* disparaît puis réapparaît à partir de J39 dans les groupes contrôle et métronidazole. Le genre *Blautia* semble être lié à la dysbiose. Ces observations semblent cohérentes avec la littérature, où l'on constate une diminution des *Lachnospiraceae* en cas de dysbiose induite par les antibiotiques (Reeves *et al.*, 2011; Theriot *et al.*, 2014). Par

ailleurs, on observe également que lorsque *C. difficile* est présente dans les échantillons, *Blautia* semble absent. Ceci suggère que *Blautia* serait un marqueur de dysbiose mais aussi un marqueur corrélé négativement à la colonisation par *C. difficile*.

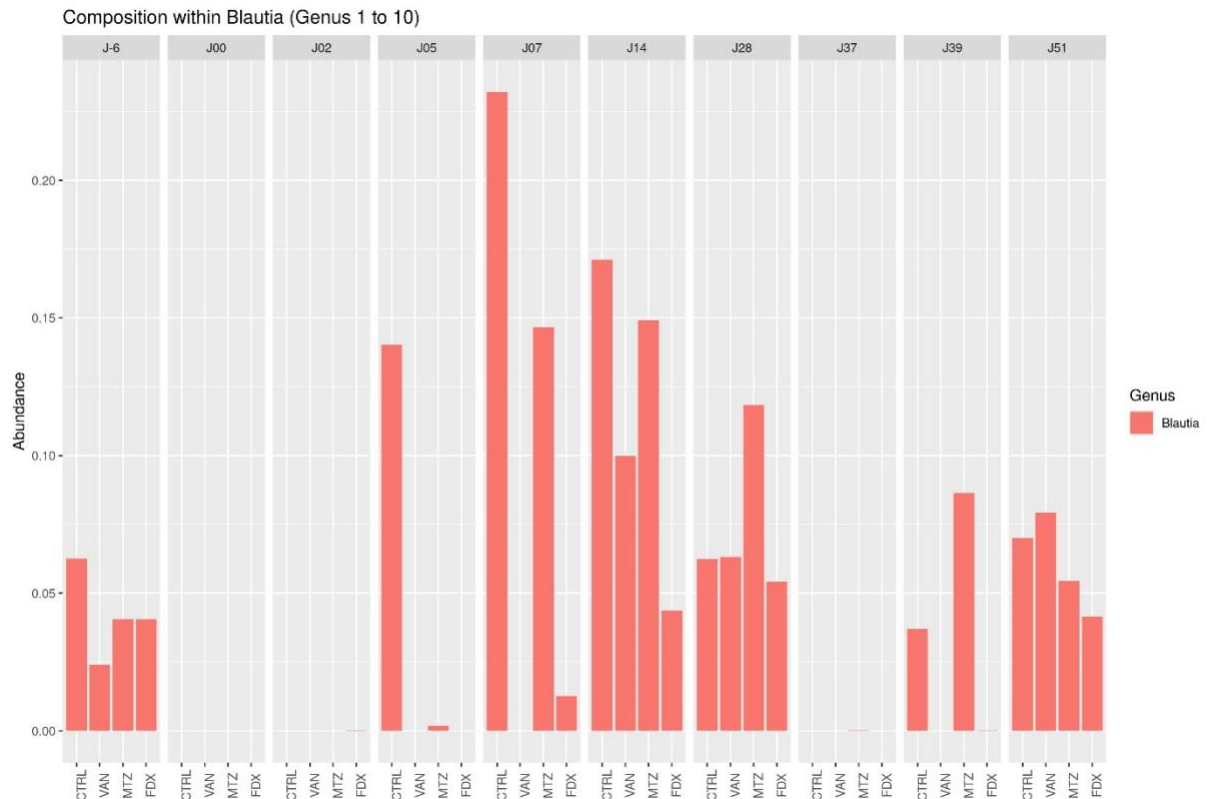


Figure 58 : Représentation de l'abondance relative des *Blautia* dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.

CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à par la fidaxomicine. Figure générée par Easy16S.

Ensuite, on observe une abondance relative faible du genre *Bacteroides* à J-6 avant la dysbiose. Cependant, à partir de J0 après la dysbiose, l'abondance relative des *Bacteroides* augmente, avec un profil variable selon les groupes. Chez les souris exposées à la vancomycine, à J5 on observe une diminution significative des *Bacteroides*. En comparaison à la vancomycine, le métronidazole et la fidaxomicine semblent les épargner (Figure 59). En outre, on observe variabilité du profil des *Bacteroides* tout au long du processus infectieux dans tous les groupes.

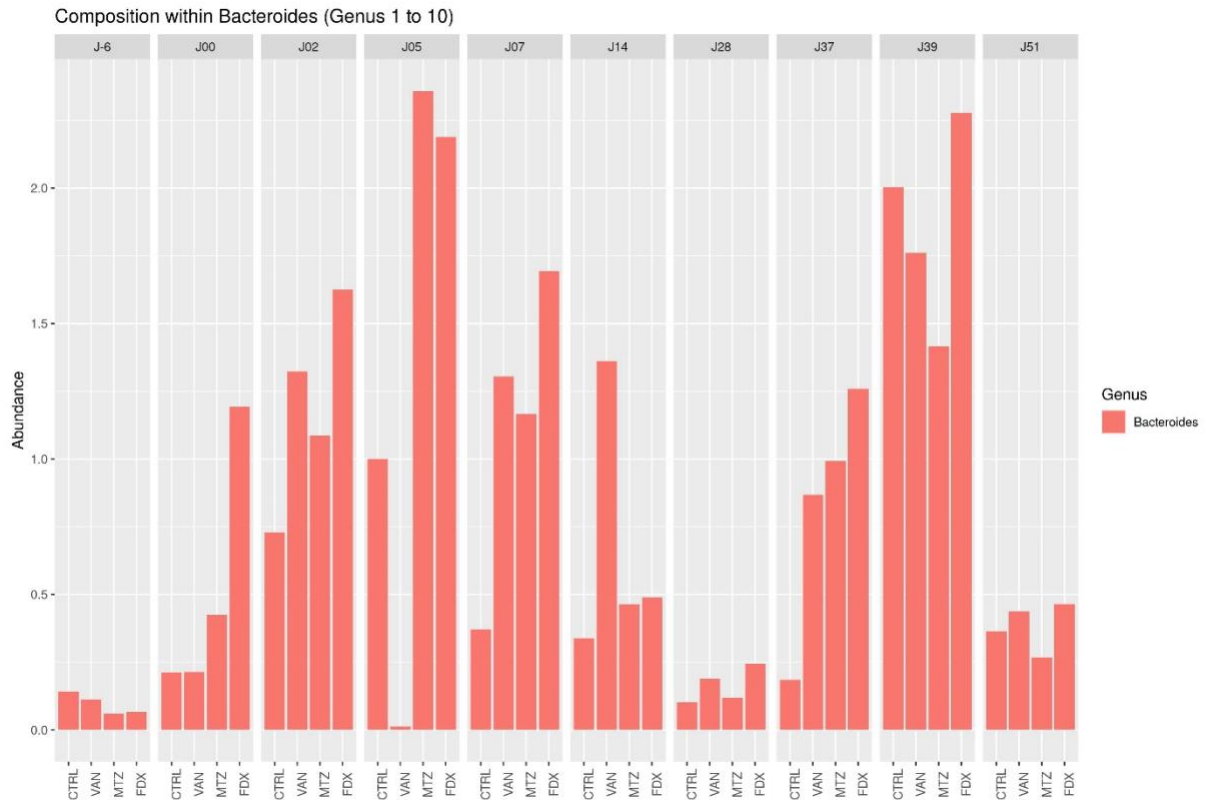


Figure 59 : Représentation de l'abondance relative des *Bacteroides* dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.

CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à la fidaxomicine. Figure générée par Easy16S.

Par ailleurs, nous avons également noté une différence d'effet des antibiotiques sur le genre *Akkermansia*. À J2, on observe une augmentation de l'abondance relative des *Akkermansia* en comparaison du J-6 et J0 où leur abondance relative était faible. A J5 et même à J7, contrairement aux *Bacteroides*, la vancomycine semble maintenir la prolifération des *Akkermansia*. A partir de J14, dans tous les on observe une diminution des *Akkermansia* jusqu'à J37 et qui réapparaissent à J39 (Figure 60).

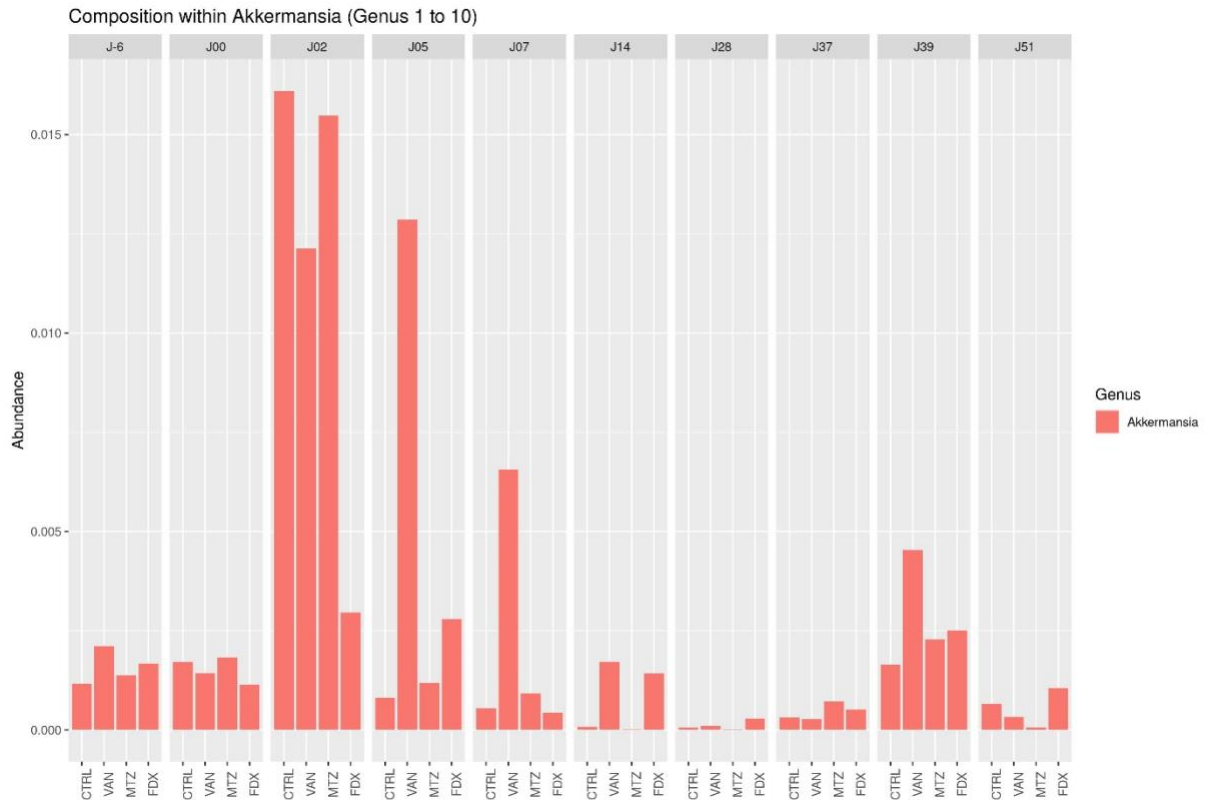


Figure 60 : Représentation de l'abondance relative des *Akkermansia* dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.

CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à la fidaxomicine. Figure générée par Easy16S.

Enfin, en considérant le genre *Alistipes* appartenant à la famille des *Rikenellaceae*, on observe une diminution de leur abondance relative avec la dysbiose induite par le cocktail d'antibiotiques à J0, qui disparaissent jusqu'à J7 dans tous les groupes sauf le groupe exposé à la fidaxomicine. Cependant, en présence de *C. difficile* dans les échantillons, les *Alistipes* semblent absents, suggérant que tout comme *Blautia*, *Alistipes* serait un marqueur corrélé négativement à la colonisation par *C. difficile* (Figure 61).

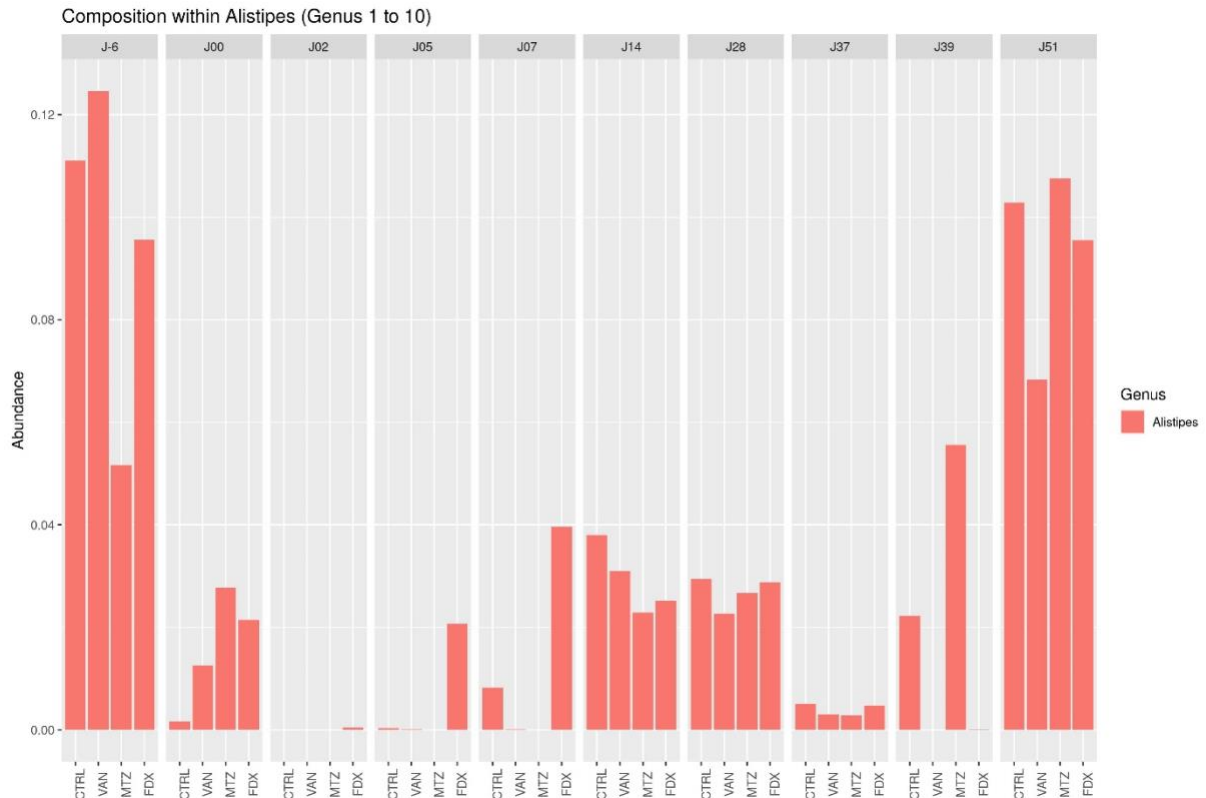


Figure 61 : Représentation de l'abondance relative du genre *Alistipes* dans 4 échantillons des groupes CTRL, VAN, MTZ et FDX après l'infection et la réinfection.

CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; VAN = groupe infecté et exposé à la vancomycine ; MTZ = groupe infecté et exposé au métronidazole ; FDX = groupe infecté et exposé à par la fidaxomicine. Figure générée par Easy16S.

Dans l'ensemble, nous avons observé un effet qui semble spécifique des différents antibiotiques de traitement utilisés. La fidaxomicine et le métronidazole semblent moins impacter la diversité du microbiote en comparaison de ce qui est observé avec la vancomycine. Nous avons également observé la disparition de certaines familles bactériennes et l'apparition d'autres familles tout au long du protocole d'infection et de réinfection par *C. difficile*. Cela suggère que *C. difficile* pourrait avoir un impact sur ces familles, ou qu'ils occupent la même niche écologique et sont inhibés par la compétition pour les nutriments.

S'agissant d'une analyse préliminaire, il sera nécessaire de réaliser une analyse différentielle afin de consolider les résultats observés.

d) Impact de la réinfection multiple sur le microbiote

Outre les groupes exposés aux différents antibiotiques, nous avons également un groupe où les souris ont été infectées quatre fois par la même souche 630 Δ erm de *C. difficile* (groupe

réinfection multiple, R). Contrairement aux autres groupes qui ont subi un traitement par le cocktail d'antibiotiques et la dose de clindamycine avant la réinfection, avant chaque réinfection, les souris du groupe R ont uniquement reçu une dose de clindamycine par voie intrapéritonéale. Un de nos objectifs a été de savoir si on retrouve un profil équivalent du microbiote au fur et à mesure de ces réinfections.

Tout d'abord, lorsqu'on observe la diversité on remarque que le groupe R présente un comportement similaire au groupe CTRL avant la dysbiose à J-6 et après la dysbiose à J0 avec une diminution de l'indice de diversité alpha entre ces moments (Figure 62).

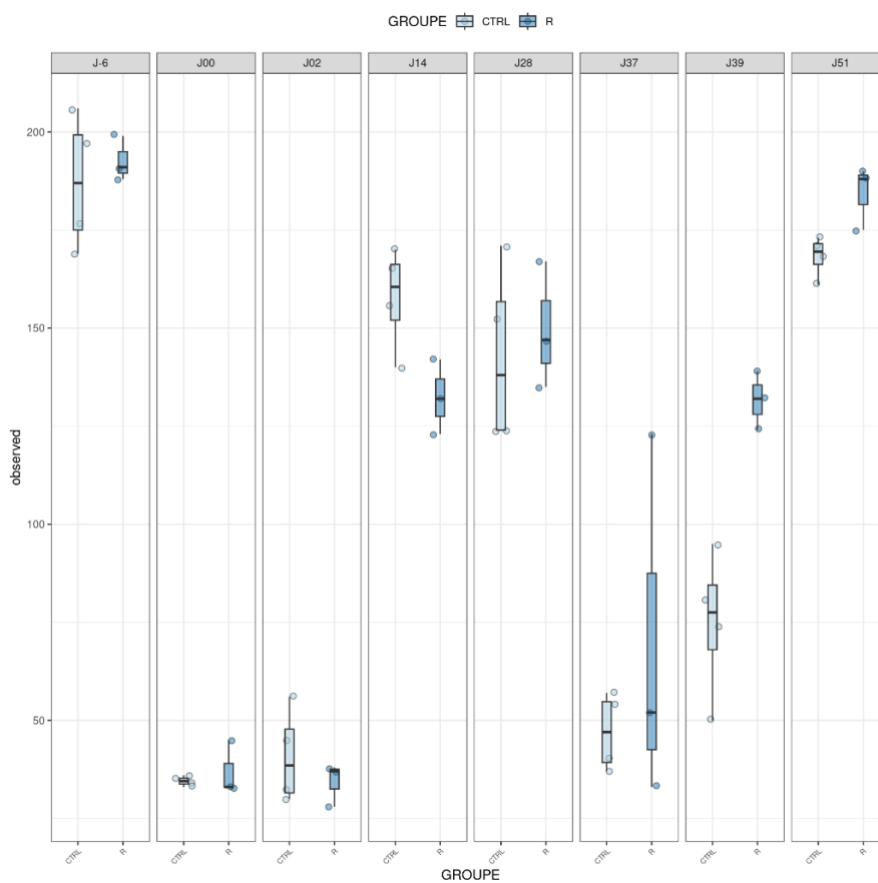


Figure 62 : Représentation de la mesure de la diversité alpha par la richesse observée dans les groupes CTRL et R.

CTRL = groupe contrôle infecté non traité ; R = groupe réinfection multiple (souris infectées 4 fois).

A partir de J14, on observe une augmentation de la diversité alpha qui tend vers celui du J-6. A J28 après l'infection et après une dose de clindamycine et une réinfection pour le groupe R, la diversité semble équivalente entre les deux groupes. Après la seconde administration du cocktail d'antibiotiques et après une troisième infection suivie d'une dose de clindamycine, la diversité alpha dans les deux groupes est réduite. Cependant, après une réinfection pour le

groupe CTRL et quatre infections pour le groupe R, l'indice de diversité alpha augmente mais à une vitesse différente. Elle semble plus rapide dans le groupe R que dans le groupe CTRL (Figure 62).

En termes de phylums, tout comme dans les autres groupes, dans le groupe R à J0, on observe une augmentation de l'abondance relative fécale des Protéobactéries et une diminution des Firmicutes et des Bacteroidetes encore observée jusqu'à J2 post-infection (Figure 63). Au fur et mesure des infections dans le groupe R, le degré de dysbiose semble de moins en moins profond avec un profil plus hétérogène entre les souris (Figure 63). Ces résultats suggèrent que le microbiote s'est adapté après chaque protocole d'induction de dysbiose par la clindamycine et les réinfections.

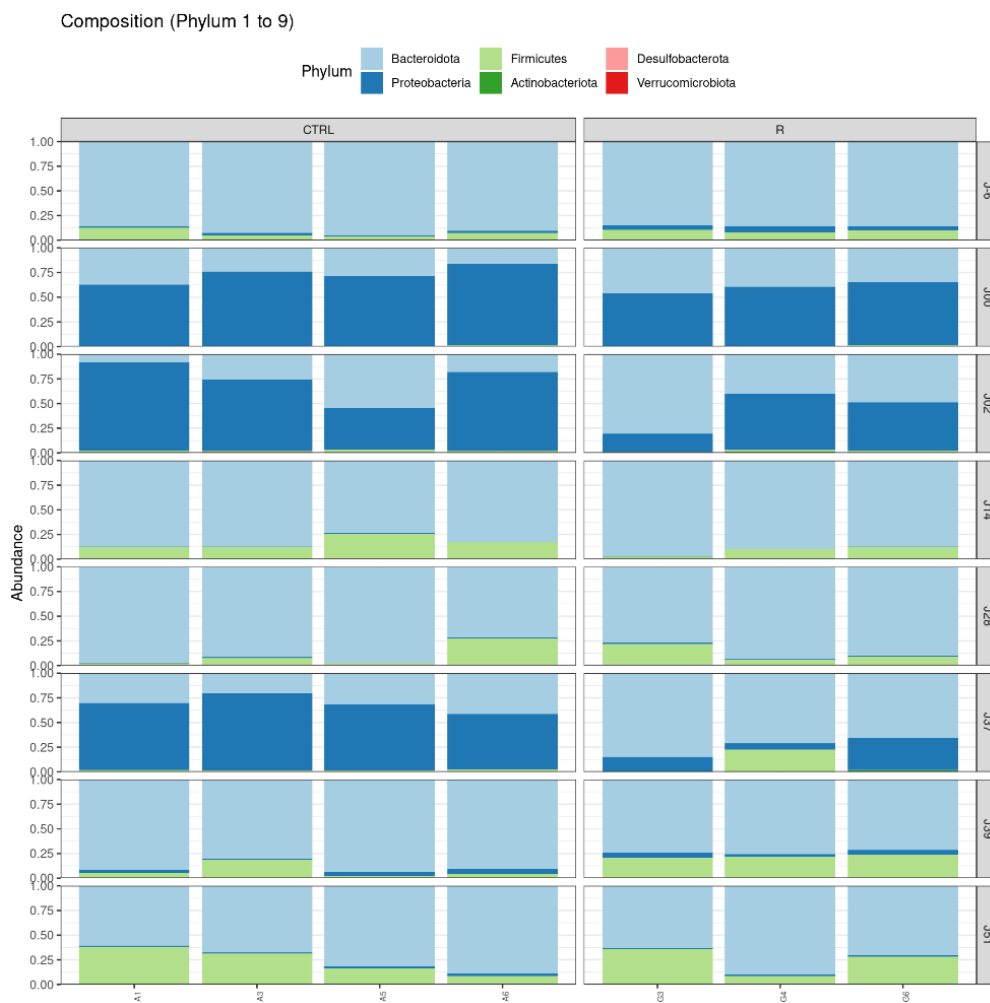


Figure 63 : Représentation de l'abondance relative des phylums du microbiote dans les échantillons des groupes CTRL et R.

A = groupe contrôle (CTRL) ; G = groupe réinfection multiple (R). Figure générée avec R studio.

4. Conclusion

Nous avons initié une analyse préliminaire des données du microbiote au cours d'une ICD chez la souris nous permettant de répondre à quelques questions prioritaires notamment la validation du modèle de dysbiose et l'impact des antibiotiques de traitement auxquels sont exposés les souris sur le microbiote. Tout d'abord nos données ont montré que nous avons effectivement induit une dysbiose importante marquée par une diminution de la diversité du microbiote qui va favoriser l'implantation de *C. difficile*. L'analyse préliminaire de la dynamique des *Clostridioides* au cours de la colonisation par *C. difficile* semble révéler deux genres bactériens *Blautia* et *Alistipes* potentiellement corrélés négativement à la colonisation par *C. difficile*. D'autre part, nous avons montré que l'induction d'une nouvelle dysbiose par le cocktail d'antibiotiques semble être suffisante pour provoquer une nouvelle infection sans pour autant réinfecter à nouveau les souris avec un inoculum de *C. difficile*. Nous avons également montré qu'une brève exposition à la vancomycine semble induire une dysbiose importante du microbiote en comparaison de l'exposition à la fidaxomicine et au métronidazole comme observé dans la littérature.

Chapitre III : Développement d'une méthode de dosage des acides biliaires dans des échantillons complexes

A. Contexte

Une des conséquences de l'altération de la composition du microbiote intestinal est la modulation du profil métabolique du microbiote, en particulier, la diminution des espèces impliquées dans la biotransformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. Cette prédominance des acides biliaires primaires va favoriser la germination des spores de *C. difficile* en formes végétatives, favorisant le processus de colonisation du tube digestif, sa multiplication et la production des toxines qui seront responsables de l'infection.

Un des objectifs secondaires de cette thèse a été le développement d'une méthode de détection et de dosage des acides biliaires dans des échantillons complexes tels que les selles ou encore les matrices issues des différents compartiments du tube digestif de la souris. Cette méthode développée permettra d'évaluer la modulation du profil des acides biliaires digestifs dans un modèle d'infection par *C. difficile* chez la souris selon différentes conditions et les différentes localisations.

Le développement de la méthode a été réalisé en collaboration avec l'équipe de la plateforme de dosage du Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph.

B. Matériels et méthodes

a) Réactifs, solvants et solutions stock

Seize molécules de référence des acides biliaires ont été commandées sous forme de poudre auprès de Sigma Aldrich, St Louis, Mo, USA (Figure 64) :

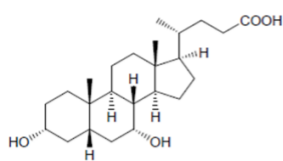
- Acide cholique (CA ; Ref : C1129)
- Acide chénodésoxycholique (CDCA ; Ref : C9377)
- Acide bêta muricholique (β -MCA ; Ref : SML2372)
- Acide omega muricholique (ω -MCA ; Ref : 700231P)
- Acide taurocholique de sodium (TCA ; Ref : T4009)
- Acide désoxycholique (DCA ; Ref : D2510)
- Acide isodésoxycholique (iDCA ; Ref : 700219P)
- Acide lithocholique (LCA ; Ref : L6250)
- Acide isolithocholique (iLCA ; Ref : 700195P)

- Acide ursodésoxycholique (UDCA ; Ref : U5127)
- Acide taurochénodésoxycholique (TCDCA ; Ref : T6260)
- Acide taurohyodésoxycholique (THDCA ; Ref : 700248P)
- Acide tauro-alpha-muricholique (TαMCA ; Ref : 700243P)
- Acide muridésoxycholique (MDCA ; Ref : 700270P)
- Acide hyocholique (HCA ; Ref : 700159P)
- Acide hyodésoxymuricholique (HDCA ; Ref : H3878)

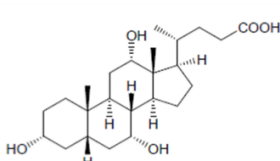
Les standards internes deutérés à 1 mg.mL⁻¹ utilisés sont l'acide cholique-d4 (CA-d4), l'acide chénodésoxycholique-d4 (CDCA-d4), l'acide désoxycholique-d4 (DCA-d4), l'acide lithocholique-d4 (LCA-d4) et l'acide taurocholique-d4 (TCA-d4) (Alsachim, Illkirch-Graffenstaden, France). Ces standards internes sont utilisés afin de s'assurer des comportements chimique et analytique similaires pour les 16 molécules.

Les solvants organiques LCMS « *Liquide chromatographiy – mass spectrometry* » utilisés sont l'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), éthanol (EtOH), 2-propanol, le dichlorométhane et le chloroforme (Sigma Aldrich).

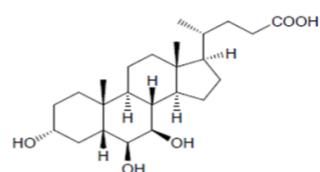
Acides biliaires primaires



Acide chénodésoxycholique (CDCA)
Homme et souris

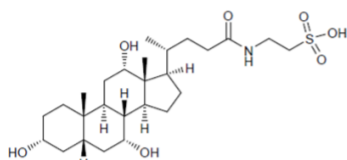


Acide cholique (CA)
Homme et souris

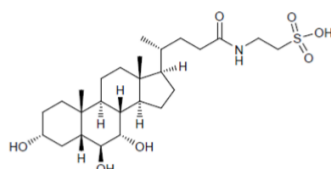


Acide beta muricholique (β-MCA)
Souris

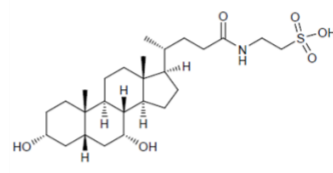
Acides biliaires primaires conjugués à la taurine



Acide taurocholique (TCA)
Homme et souris

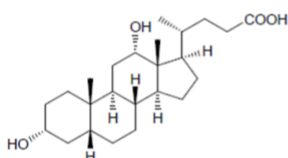


Acide tauro alpha muricholique (TαMCA)
Souris

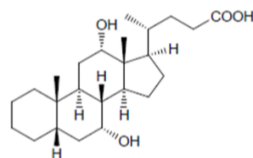


Acide taurochénodésoxycholique (TCDCA)
Homme et souris

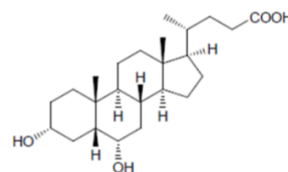
Acides biliaires secondaires



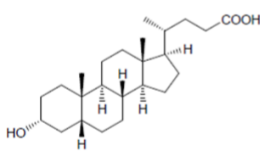
Acide désoxycholique (DCA)
Homme et souris



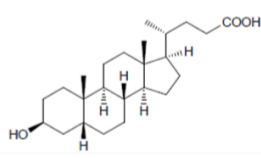
Acide isodésoxycholique (iDCA)
Homme et souris



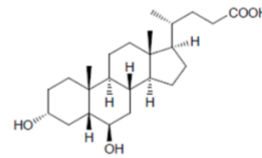
Acide hyodésoxycholique (HDCA)
Homme et souris



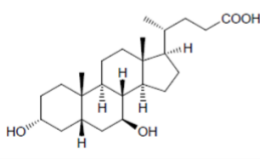
Acide lithocholique (LCA)
Homme



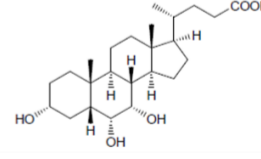
Acide isolithocholique (iLCA)
Homme



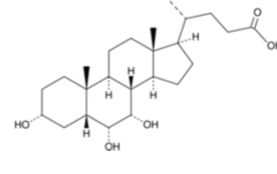
Acide muridésoxycholique (MDCA)
Souris



Acide ursodésoxycholique (UDCA)
Homme et souris

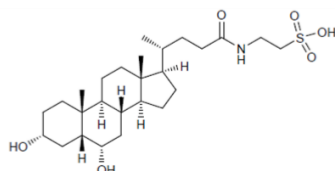


Acide omega muricholique (ω-MCA)
Souris



Acide hyocholique (HCA)
Homme et souris

Acide biliaire secondaire conjugué à la taurine



Acide taurohyodésoxycholique (THDCA)
Souris

Figure 64 : Représentation de Fischer et espèces d'origine des 16 acides biliaires primaires et secondaires utilisés comme référence dans le développement de la méthode.

b) Solutions de travail

Les poudres d'acides biliaires ont été utilisées pour réaliser des solutions de travail à 1 mg.mL^{-1} de chaque molécule en utilisant comme solvant de l'acétonitrile (ACN) et/ou du diméthylsulfoxyde (DMSO) qui ont été ajoutés graduellement en fonction de l'aspect de la solution. Les solutions ont été mélangées au vortex et soniquées jusqu'à l'obtention de solutions limpides. Les solutions obtenues sont stockées à -80°C afin d'assurer une parfaite conservation. Des solutions à 1 mg.mL^{-1} respectives de chaque standard interne ont été réalisées en utilisant du méthanol comme solvant. La conservation est assurée à -80°C .

c) Séparation des isomères des acides biliaires de référence par UHPLC ESI-MC

Afin de déterminer les caractéristiques de détection des différents isomères des acides biliaires de référence par UHPLC, des solutions de référence à une concentration de 50 mg.L^{-1} sont réalisées en ajoutant $10 \mu\text{l}$ de solution mère à 1 mg.mL^{-1} aux $190 \mu\text{l}$ d'ACN. Un volume de $10 \mu\text{L}$ de chaque solution de référence des acides biliaires est injecté dans un système chromatographique UHPLC disposant de deux colonnes de détection (ThermoScientific, Les Ulis, France) : une C18 Hypersil GOLD (dimension $50 \times 2,1 \text{ mm}$) et une C30 Accucore™ (dimension $50 \times 2,1 \text{ mm}$). Le système de chromatographie UHPLC se compose d'un passeur automatique d'échantillons Ultimate 3000 UHPLC couplé à la spectrométrie de masse à polarité négative (« *Electrospray ionization – Mass spectrometry* » ESI-MS) (Exactive plus Orbitrap), Thermo Scientific). L'élution se fait en gradient en utilisant de l'eau de qualité HPLC et de l'ACN contenant $0,1\%$ d'acide formique comme phase mobile A et B, respectivement. Les paramètres du gradient ont été définis après plusieurs essais. Des résultats intermédiaires sont obtenus et le gradient final utilisé commence par 80% de la phase mobile A et 20% de la phase B et évolue comme dans le tableau ci-dessous (Tableau 8).

Tableau 8 : Gradient d'élution pour la séparation des acides biliaires

Temps (min)	Eau HPLC (0,1% acide formique)	ACN (0,1% acide formique)
0,00	80,0	20,0
0,02	80,0	20,0
0,32	60,0	40,0
2,32	55,0	45,0
3,62	0	100,0
3,82	0	100,0
5,82	80,0	20,0
6,02	80,0	20,0

d) Test de sensibilité et limite de détection (LOD)

Une solution mélangeant les 16 acides biliaires de référence à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (10 mg.L^{-1}) a été préparée ($10 \mu\text{L}$ de chaque acide biliaire à 1 mg.mL^{-1} puis complétée avec $840 \mu\text{L}$ d'ACN). Les échantillons sont ensuite dilués en cascade de 2 en 2 de 10 mg.L^{-1} à $0,0003 \text{ mg.L}^{-1}$ dans un volume final de $500 \mu\text{L}$, afin de déterminer la concentration minimale pouvant être détectée par l'UHPLC.

e) Protocole final d'extraction

Un protocole d'extraction adapté de ceux de Li *et al.*, 2015 et Sillner *et al.*, 2018 a été défini en faisant varier plusieurs paramètres parmi les solvants, le temps d'incubation, le temps de la sonication, la température et l'évaporation. Des résultats intermédiaires sont obtenus et le protocole final utilisé se présente comme suit.

Un mélange de standards internes de concentrations connues à l'issue du test de sensibilité (Tableau 9) est ajouté sur des selles pré-pesées afin de s'assurer de l'efficacité de l'extraction.

Tableau 9 : Concentration de standards internes utilisées pour les extractions

	Concentration à ajouter en mg.L^{-1}
$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{-d4}$ (CA-d4)	2,5
$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{-d4}$ (CDCA-d4)	2,5
$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{-d4}$ (DCA-d4)	2,5
$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{-d4}$ (LCA-d4)	10
$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_{6/7}\text{S-d4}$ (TCA-d4)	1,25

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus en référence au poids sec des échantillons, le mélange de standards internes et de selles est séché par concentration sous vide (SpeedVac, ThermoScientific, Les Ulis, France) pendant 2h à 45°C à 1 tour/min (Figure 65). Cette étape est suivie d'une extraction au méthanol et à l'isopropanol (1 mL , v/v) comprenant une étape de sonication à 55°C et un chauffage à 80°C . Les surnageants sont récupérés puis évaporés par concentration sous vide (40 min à 45°C à 1 tour/min). Un lavage du culot avec méthanol et isopropanol (1 mL , v/v) suivi d'un chauffage à 80°C est réalisé afin de concentrer l'extrait. Après centrifugation, les surnageants sont récupérés et regroupés avec les premiers surnageants dans les tubes correspondants puis sont évaporés au SpeedVac (1 h à 45°C à 1 tour/min). Les extraits sont ensuite suspendus de nouveau dans $500 \mu\text{L}$ de phase mobile initiale (80% eau HPLC, 20% acétonitrile, 0,1 % acide formique et 1% d'isopropanol) puis soniqués afin d'homogénéiser la solution. Les solutions sont centrifugées pour séparer les particules solides et $10 \mu\text{L}$ des surnageants sont ensuite injectés pour la séparation dans l'UHPLC (Figure 65).

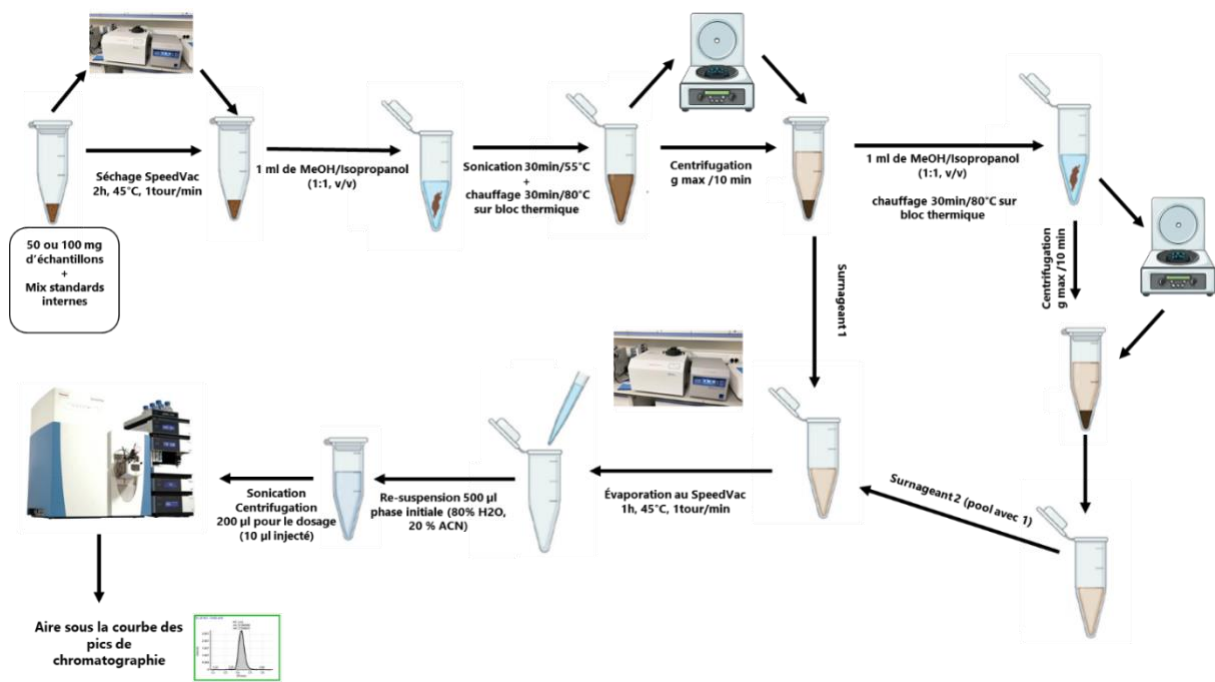


Figure 65 : Protocole d'extraction des acides biliaires dans un échantillon de selle de souris.

L'aire sous la courbe de chaque pic est déterminée par intégration automatique réalisée par le logiciel Tracefinder version 5.1 (ThermoScientific). Les temps de rétention des composés sont obtenus par l'injection d'acides biliaires de référence.

f) Echantillons biologiques

Des échantillons de selles de souris C57BL/6J ont été prélevés pour réaliser un premier essai de profilage des acides biliaires. Ces échantillons de selles proviennent d'une expérimentation animale réalisée au laboratoire par l'équipe BaPS. Des selles issues de deux groupes de souris ont été utilisées. Le premier groupe de souris avec la dysbiose post-antibiotiques et infecté avec la souche épidémiologique R20291 de *C. difficile* (groupe A) et le second groupe de souris avec la dysbiose, infecté par la souche R20291 puis traité par la vancomycine de J1 à J6 post-infection (groupe B) selon le protocole infectieux ci-dessous (Figure 66). Les échantillons ont été ensuite regroupés par 2 pour des raisons de quantité minimale d'échantillon et l'extraction a été réalisée.

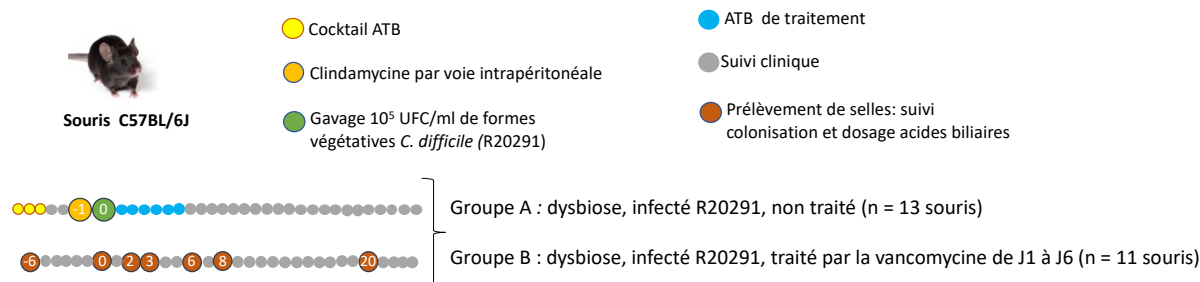


Figure 66 : Protocole infectieux subi par les souris des différents groupes.

L'essai a été réalisé selon le protocole expérimental précédemment décrit (Figure 66). Un jour après l'infection par la souche R20291 de *C. difficile* et le groupe de souris correspondant a été traité par la vancomycine pendant 6 jours. Les paramètres cliniques des souris sont suivis selon le score clinique habituel, en particulier, la présence de diarrhées (selles molles ou liquides et/ou queues mouillées), l'activité physique et l'évolution du poids, une perte au pic de l'infection étant l'un des signes cliniques de l'infection.

Les échantillons de selles ont été prélevés à différents temps séquentiels (J-6, J0, J2, J6, J8 et J20) et conservés à -20°C jusqu'au jour de l'analyse.

C. Résultats

a) Optimisation des paramètres séparation et de détection par l'UHPLC-ESI-MS (Exactive Plus Orbitrap)

Des injections de la solution de chacun des acides biliaires individuels sont réalisées afin de déterminer les paramètres optimaux de détection pour chaque acide biliaire de référence. Les analyses ont été menées en utilisant des colonnes C18 et C30 et différents gradients ont été testés. Les résultats obtenus avec les deux colonnes n'ont montré aucune différence significative. La colonne C18 est retenue pour la suite des analyses.

L'élution des 16 acides biliaires de référence est réalisée en moins de 7 minutes (Figure 67).

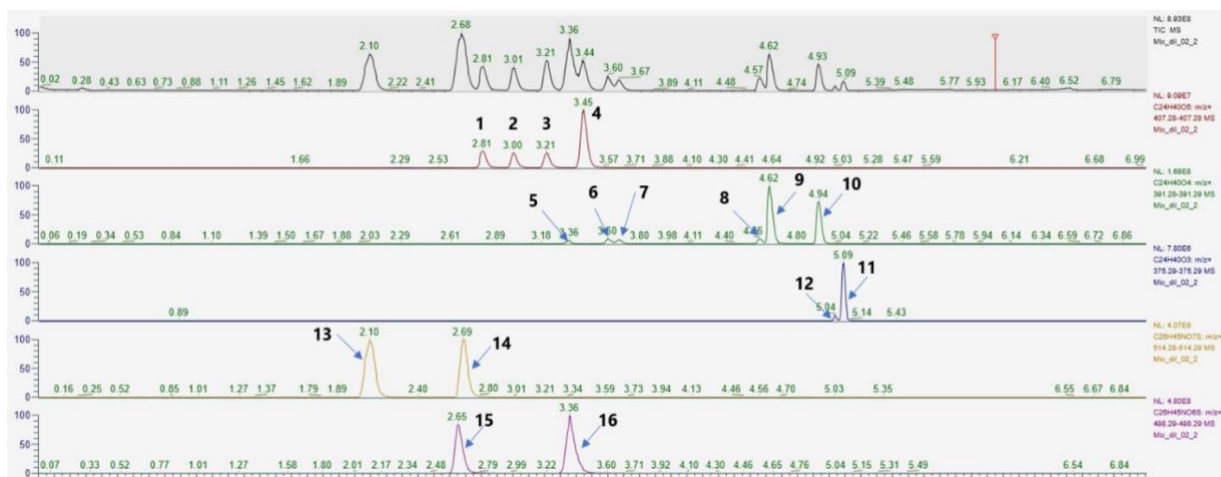


Figure 67 : Temps d'élution des acides biliaires de référence.

1 = ω -MCA ; **2** = β -MCA, **3** = HCA ; **4** = CA ; **5** = MDCA ; **6** = UDCA ; **7** = HDCA ; **8** = CDCA ; **9** = DCA ; **10** = iDCA ; **11** = LCA ; **12** = iLCA ; **13** = T α MCA ; **14** = TCA ; **15** = THDCA ; **16** = TCDCA. Les acides biliaires ont été regroupés en fonction de leur isomère. $C_{24}H_{40}O_5$ (CA, ω -MCA, β -MCA et HCA) ; $C_{24}H_{40}O_4$ (CDCA, DCA, iDCA, UDCA, HDCA, MDCA) ; $C_{24}H_{40}O_3$ (iLCA et LCA) ; $C_{26}H_{45}NO_7S$ (TCA et T α MCA) et $C_{26}H_{45}NO_6S$ (THDCA et TCDCA).

Les acides biliaires polaires ($C_{24}H_{40}O_4$) et sulfatés ($C_{26}H_{45}NO_7S$ et $C_{26}H_{45}NO_6S$) sont élués plus rapidement que les acides biliaires apolaires ($C_{24}H_{40}O_5$ et $C_{24}H_{40}O_3$). La séparation des isomères de type $C_{24}H_{40}O_4$ notamment les paires CDCA et DCA, HDCA et UDCA, LCA et iLCA n'est pas optimale. Une nouvelle solution d'élution et une modification des paramètres de séparation pourrait se révéler nécessaire. Les temps de rétention de chaque acide biliaire sont synthétisés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Temps de rétention de chaque acide biliaire de référence sur la colonne C18 et le ratio masse sur charge des isomères (m/z) [M=H]⁺.

Formule	Ratio masse sur charge (m/z) [M=H] ⁺	Nom		Temps de rétention en min (C18)
C₂₄H₄₀O₅	407,2803	Acide cholique	CA	3,44
		Acide hyocholique	HCA	3,21
		Acide bêta-muricholique	β-MCA	3,00
		Acide omega-muricholique	ω-MCA	2,80
C₂₄H₄₀O₄	391,28538	Acide isodeoxycholique	iDCA	4,94
		Acide deoxycholique	DCA	4,62
		Acide chenodeoxycholique	CDCA	4,56
		Acide hyodeoxycholique	HDCA	3,67
		Acide ursodeoxycholique	UDCA	3,60
		Acide murideoxycholique	MDCA	3,36
C₂₄H₄₀O₃	375,29047	Acide lithocholique	LCA	5,09
		Acide isolithocholique	iLCA	5,04
C₂₆H₄₅NO₇S	514,2844	Acide taurocholique	TCA	2,69
		Acide tauro-alpha-muricholique	TαMCA	2,10
C₂₆H₄₅NO₆S	498,28948	Acide taurochénodéoxycholique	TCDCA	3,36
		Acide taurohyodeoxycholique	THDCA	2,65

b) Efficacité du protocole d'extraction

L'efficacité des extractions a été vérifiée en rajoutant un mélange de standards internes deutérés aux selles avant l'extraction. Les concentrations nécessaires en standards internes ont été déterminées par comparaison avec les limites de détection des acides biliaires. Un premier

test d'extraction a été réalisé dans différents échantillons. Une comparaison a été faite entre les échantillons sur lesquels ont été rajouté les standards internes deutérés qui ont subi tout le processus d'extraction par rapport à une solution mixte de standards internes sans selle et qui n'a subi aucun processus d'extraction (Figure 68).

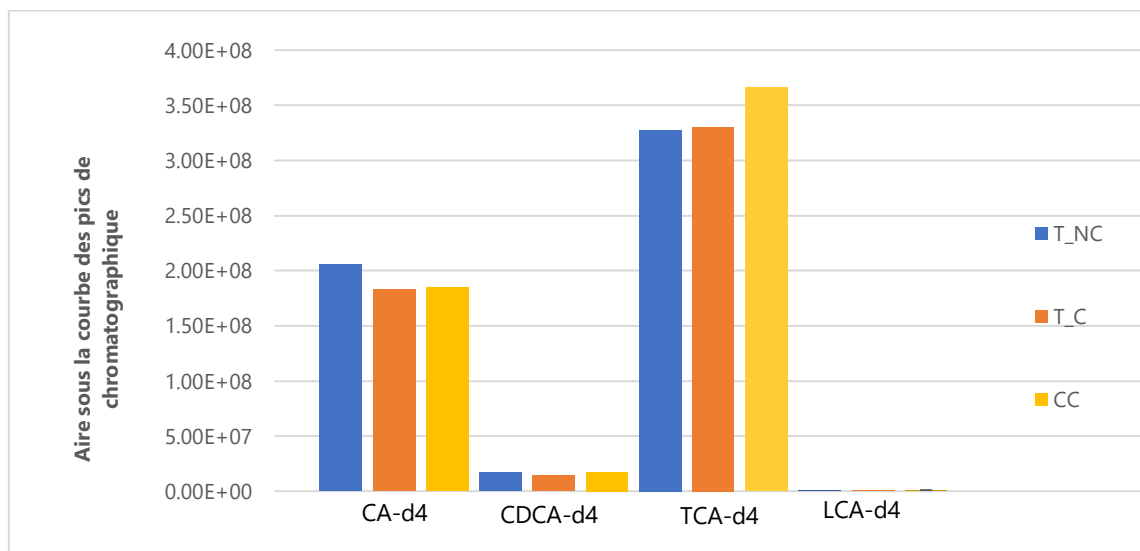


Figure 68 : Comparaison des aires sous la courbe des pics de chromatographie de quatre acides biliaires deutérés en fonction de la méthode d'extraction des acides biliaires d'un échantillon de contenu caecal de la souris.

T_NC : témoin, aucun processus d'extraction ; T_C : processus d'extraction complet ; CC : duplicatas de 50 mg de contenu caecale sur lequel a été ajouté un mélange de standards internes.

CA-d4 : acide cholique-d4 ; CDCA-d4 : acide chénodésoxycholique-d4 ; DCA-d4 : acide désoxycholique-d4 ; LCA-d4 : acide lithocholique-d4 ; TCA-d4 : acide taurocholique-d4

On n'observe pas de différence entre le mélange des standards internes ayant subi tout le processus d'extraction en comparaison d'un mélange n'ayant subi aucun processus d'extraction. Le protocole d'extraction ne semble pas dégrader les acides biliaires, ce protocole peut être donc utilisé pour la suite du développement. L'intensité des deutérés de $C_{24}H_{40}O_4$ (CDCA-d4) et du $C_{24}H_{40}O_3$ (LCA-d4) sont faibles par rapport à $C_{24}H_{40}O_5$ (CA-d4) et à $C_{26}H_{45}NO_7S$ (TCA-d4). Le LCA-d4 n'est pas visible sur l'histogramme car il est à la limite de détection du signal à 10^5 et ce quel que soit le protocole testé

c) Optimisation de l'extraction par le séchage

Dans le but de d'obtenir des résultats comparables en poids sec, des comparaisons de séchage en utilisant un incubateur à 37°C, un SpeedVac et un témoin consistant en une extraction sans séchage préalable ont été effectuées. Afin de s'assurer que la chaleur ne provoque pas de dégradation des acides biliaires, un contrôle est réalisé par ajout d'un mélange de standards internes deutérés dans les selles avant le séchage.

On n'observe pas de différence significative entre la méthode de séchage à 37°C et celle au SpeedVac pour les standards internes CA-d4, CDCA-d4 et DCA-d4 qui semblent être bien conservés (Figure 69). Comparativement à ces standards internes, TCA-d4 semblent plus impacté à 37°C qu'avec le SpeedVac (Figure 69). Considérant l'ensemble des données, le séchage au SpeedVac semble moins dégrader les standards internes par rapport au séchage à 37°C. Cependant comparé aux selles non séchées, une perte d'acides biliaires significative est observée pour le TCA-d4 avec le séchage quelle que soit la méthode. Cette perte est non significative pour les autres acides biliaires testés.

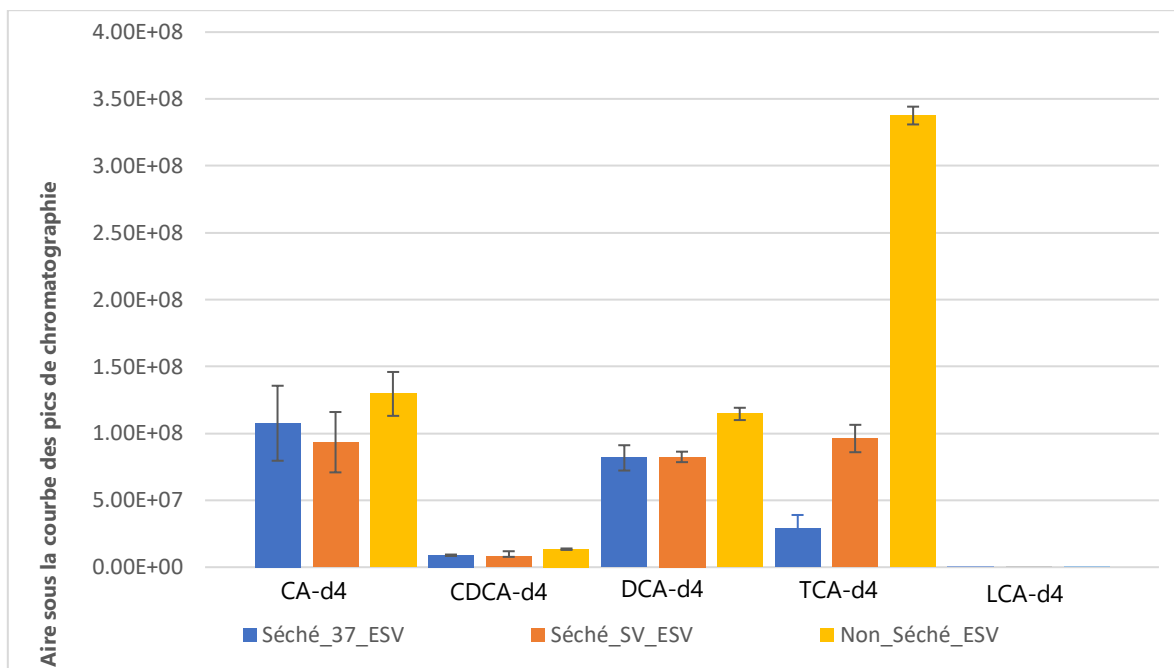


Figure 69 : Comparaison des aires sous la courbe de pics chromatographiques d'acides biliaires en fonction de la méthode de séchage des selles avant l'extraction.

SV : SpeedVac ; ESV : évaporation au SpeedVac ; CA-d4 : acide cholique-d4 ; CDCA-d4 : acide chénodésoxycholique-d4 ; DCA-d4 : acide désoxycholique-d4 ; LCA-d4 : acide lithocholique-d4 ; TCA-d4 : acide taurocholique-d4

L'objectif était de comparer les proportions relatives des différents acides biliaires dans les selles et non une quantification. Ainsi, une comparaison sur selles séchées était indispensable afin de normaliser nos résultats. Nous ne pouvions donc pas utiliser des selles avec un pourcentage d'eau différent et que nous ne pouvions pas comparer, non maîtrisable, nous avons donc décidé de sécher les selles avec la méthode la plus douce et donc par le séchage au SpeedVac.

d) Essai de profilage des acides biliaires dans les selles de souris infectées par *C. difficile*

Des selles de 2 groupes de souris dont le un groupe de souris avec une dysbiose et infecté avec la souche de *C. difficile* R20291 (groupe A) et un groupe de souris avec une dysbiose, infecté et traité par la vancomycine de J1 à J6 post gavage (groupe B) ont été collectées. En termes de colonisation, les souris du groupe B ne sont dans un premier temps pas colonisées en raison du traitement par la vancomycine mais avec l'arrêt du traitement, on observe une colonisation jusqu'à une clairance à J20 post-infection (Figure 70). En comparaison, dans le groupe A on observe une décolonisation progressive jusqu'à la clairance totale de la forme végétative à J14 post-infection (Figure 70). La comparaison des profils des acides biliaires en fonction du temps avec un traitement ou non à la vancomycine est présentée dans la Figure 71.

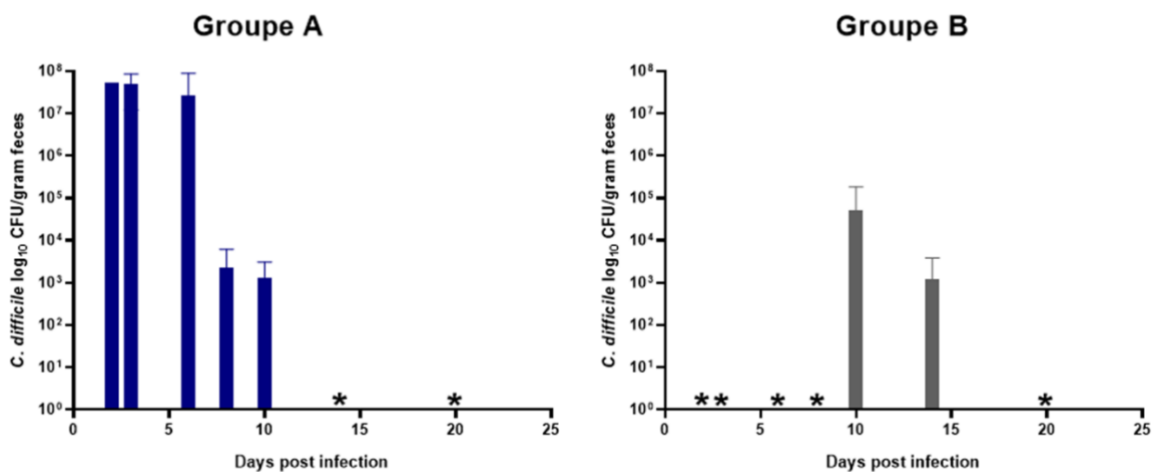


Figure 70 : Suivi de la colonisation par *C. difficile* de selles de souris utilisées pour l'essai de profilages des acides biliaires.

Groupe A : souris avec une dysbiose et infectées par la souche de *C. difficile* R20291

Groupe B : souris avec une dysbiose, infectées et traitées par la vancomycine de J1 à J6 post gavage

* = <10³ UCF/g de selles de formes végétatives détectables

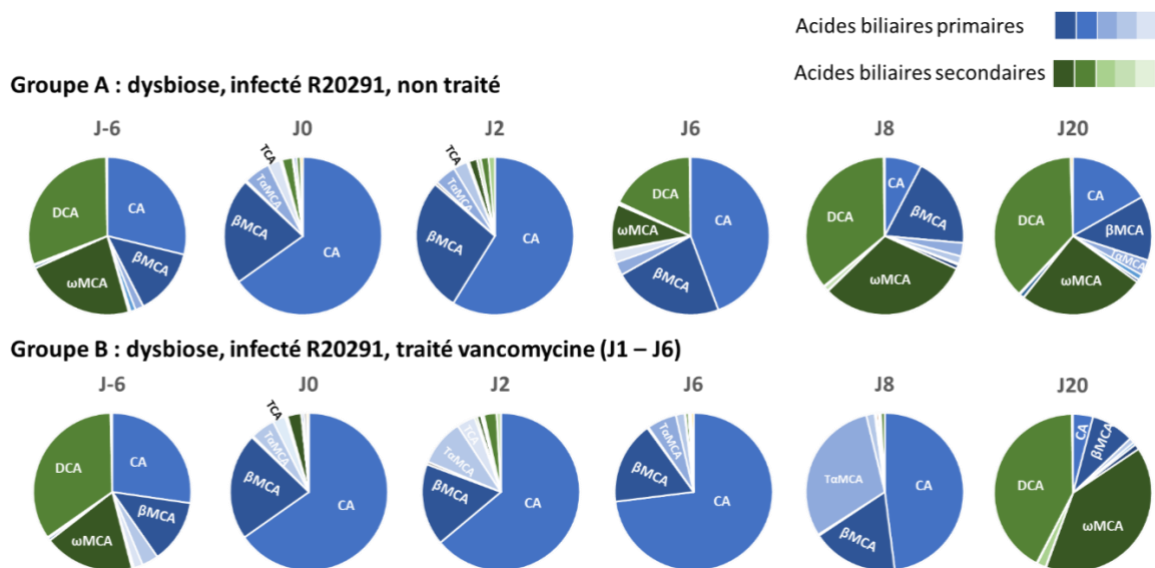


Figure 71 : Profilage des acides biliaires primaires et secondaires dans les selles de souris infectées par *C. difficile*.

Les données sont représentées en proportion d'acides biliaires primaires et secondaires par rapport à la quantité totale d'acides biliaires présente dans l'échantillon, rapportée au poids sec (à partir des données brutes d'aire sous la courbe du pic chromatographique).

Groupe A : souris avec une dysbiose et infectées par la souche de *C. difficile* R20291

Groupe B : souris avec une dysbiose, infectées et traitées par la vancomycine de J1 à J6 post gavage

CA : acide cholique, β -MCA : acide bêta muricholique, ω -MCA : acide omega muricholique, TCA : acide taurocholique de sodium, DCA : acide désoxycholique, T α MCA : acide tauro-alpha-muricholique

Avant l'induction de la dysbiose par le cocktail d'antibiotiques suivi de la dose de clindamycine (J-6), on observe un profil équivalent en acides biliaires dans les deux groupes avec un rapport en faveur des acides biliaires secondaires. Après la dysbiose, le jour de l'infection (J0), on observe une perte importante des acides biliaires secondaires en faveur des acides biliaires primaires dans les deux groupes, ce qui est maintenu jusqu'à J2 post-infection. A partir du jour 6 post-infection (J6), les profils diffèrent suivant les groupes. On observe la réapparition des acides biliaires secondaires dans le groupe non traité par la vancomycine. Ils redeviennent même majoritaires à partir de J8. En revanche, dans le groupe traité par la vancomycine, les acides biliaires secondaires étaient à l'état de traces à J6 et même à J8 post-infection. A J20 post-infection, les acides secondaires sont majoritaires dans les deux groupes. Nos résultats montrent que la dysbiose induite par le cocktail d'antibiotiques perturbe bien le microbiote et par conséquent altère la proportion des acides biliaires secondaires en faveur des acides biliaires secondaires dans les selles. Par ailleurs, le traitement par la vancomycine pendant 6 jours a conduit à une dysbiose additionnelle et au maintien du profil en faveur des acides biliaires primaires. L'arrêt du traitement a favorisé le retour à un état d'équilibre entre les acides biliaires.

D. Conclusion

Un protocole d'extraction et séparation des acides biliaries par l'UHPLC a été mis au point. Cette méthode a permis de suivre les modifications des profils d'acides biliaries primaires et secondaires dans un modèle de colonisation et d'infection par *C. difficile* chez la souris qu'il sera possible de comparer avec les données de la littérature.

Pour démontrer le rôle des acides biliaries dans l'implantation et le développement des ICD, la plupart des études utilisent le modèle de dysbiose induite par la céfopérazone chez des souris.

En utilisant le modèle de colonisation et d'infection adapté de Chen *et al.*, qui consiste en un traitement des souris par un cocktail d'antibiotiques suivi d'une dose de clindamycine, nous avons obtenu un profil semblable à celui observé en utilisant le modèle de traitement par la céfopérazone (Chen *et al.*, 2008). En effet, ce protocole a permis de démontrer que la dysbiose induite par les antibiotiques conduit à une modification de la répartition des acides biliaries en faveur des acides biliaries primaires comme cela avait pu être observé précédemment dans d'autres études (Theriot *et al.*, 2016).

Ces données valident donc la caractérisation de la modulation du profil des acides biliaries pendant l'ICD avec le protocole de Chen *et al.* Ces premiers résultats sont encourageants mais il reste à optimiser la méthode d'extraction, à finaliser le protocole de la quantification en incluant une courbe d'étalonnage et à valider ces méthodes sur de nouveaux échantillons notamment ceux provenant des différents compartiments du tube digestif (estomac, intestin grêle, côlon et contenu caecal) afin de pouvoir les corrélés à la mise en place et l'évolution de l'infection par *C. difficile*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

Les principaux objectifs de cette thèse ont consisté à évaluer l'impact de différents antibiotiques d'intérêt clinique sur la colonisation digestive par *C. difficile* mais aussi sur la modulation du microbiote et de la réponse immune adaptative dirigée contre les toxines de *C. difficile*.

Pour cela, nous avons utilisé un modèle de colonisation et d'infection par *C. difficile* où des souris femelles C57BL/6J ont été infectées avec la souche 630 Δ erm de *C. difficile*. Plusieurs groupes de souris ont été exposés pendant deux jours consécutifs soit à de la vancomycine, de la fidaxomicine, du métronidazole ou de la céfoxitine au deuxième jour post-infection après l'acmé des manifestations cliniques. L'objectif initial de ces deux jours d'exposition à différents antibiotiques était de provoquer la mort voire la lyse bactérienne de *C. difficile* afin de rendre disponibles les différents antigènes de la surface bactérienne et d'augmenter leur exposition aux cellules effectrices de l'immunité afin d'évaluer l'impact potentiel sur la réponse immune.

Au cours du protocole infectieux, nous avons introduit une étape de réinfection tardive à distance du premier épisode afin de suivre la nouvelle colonisation digestive, les signes cliniques d'ICD et l'évolution de la réponse immune adaptative. De plus, nous avons constitué un groupe spécifique dans lequel les souris ont été infectées quatre fois par la même souche de *C. difficile* avec une dose de clindamycine administrée par voie intrapéritonéale la veille de chaque réinfection. Cette condition avait pour objectif d'évaluer l'impact d'une exposition répétée à *C. difficile*.

Notre modèle nous a permis d'obtenir des collections biologiques à différents temps afin de répondre aux questions posées au cours de cette thèse. Au préalable, il a été nécessaire de mettre au point plusieurs techniques et outils afin d'analyser les échantillons notamment la production et purification des toxines et de plusieurs protéines de surface dans des clones recombinants de *C. difficile* et une technique d'ELISA quantitatif pondéral.

1. Production et purification des toxines recombinantes chez *C. difficile*

Tout d'abord, dans ce travail, nous avons pu réaliser des constructions génétiques qui nous ont permis de produire et de purifier les toxines TcdA et TcdB de *C. difficile* dans la souche 630 Δ erm. Bien que le rendement obtenu soit relativement faible par rapport à celui obtenu avec les souches recombinantes de *Bacillus megaterium* exprimant les toxines, nous avons montré par différents tests de fonctionnalité que les toxines produites sont biologiquement actives en comparaison des toxines natives fournies par notre collaborateur Michel Popoff (Burger *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008). Il serait nécessaire d'optimiser le protocole de production afin d'augmenter ces rendements de production. Pour cela, il serait possible d'augmenter le

temps d'induction de la production des toxines par l'anhydro-tétracycline au lieu de 4h comme réalisé dans notre protocole final. Nous pouvons également optimiser la lyse des cellules de *C. difficile*. Cette optimisation se fait généralement par l'ajout de DNase ou de lysozyme dans le tampon de lyse. Dans un essai d'optimisation, nous avons rajouté de la DNase I (desoxyribonuclease I from bovine pancreas, Sigma) dans le tampon de lyse, cependant, celle-ci a augmenté la viscosité du lysat ce qui a par conséquent rendu difficile le passage du surnageant sur la colonne chromatographique. En ce qui concerne le lysozyme, il faudrait ajouter une quantité conséquente dans le tampon de lyse, de plus, il n'est pas très efficace sur *C. difficile*. En effet, la cible principale de lysozyme est le peptidoglycane acétylé cependant chez *C. difficile*, le peptidoglycane est majoritairement déacétylé (Kaus *et al.*, 2020).

D'autre part, les constructions ont été réalisées dans la souche 630 Δ *erm* de *C. difficile*, qui se révèle être une souche flexible et facilement modifiable en termes d'ingénierie génétique. En effet, la manipulation génétique de *C. difficile* est très complexe, ce n'est qu'à partir des années 2010 qu'il a été possible de faire des mutants chez *C. difficile* par les systèmes de recombinaison homologue. Par conséquent, la disponibilité de ces souches recombinantes dans notre soucheotèque confère un grand avantage dans la production et purification des versions tronquées ou mutées des toxines qui pourraient être utilisées dans l'étude de la spécificité de liaison aux récepteurs au niveau de l'épithélium intestinal de l'hôte (Tao *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2022). Ces toxines tronquées ou mutées pourraient permettre de mieux comprendre le rôle de TcdA et TcdB *in vitro* et *in vivo* dans la physiopathologie des infections à *C. difficile* pour à terme développer de nouvelles stratégies thérapeutiques

Enfin, ces toxines produites pourront être administrées après inactivation par le formaldéhyde ou inactivation par deux cycles d'autoclave à 120°C à des lapins afin de produire des anticorps polyclonaux pour des analyses d'immunoblot ou d'immunomarquage afin d'identifier spécifiquement ces toxines dans différents types d'échantillons notamment dans des essais *in vivo*. Il serait en effet particulièrement intéressant de localiser les toxines dans des échantillons de muqueuses de souris traitées ou non par des antibiotiques ou encore des souris auxquelles on aurait administré des probiotiques ayant comme effet potentiel une baisse de la production des toxines.

2. La dynamique de colonisation digestion par *C. difficile*

- **La colonisation observée est-elle comparable à celle observée dans d'autre modèle ?**

En utilisant le modèle adapté du protocole décrit par Chen *et al.*, (Chen *et al.*, 2008), nous avons observé une décolonisation progressive jusqu'à une clairance naturelle des formes végétatives

déTECTABLES de la souche 630 Δ erm de *C. difficile* dans le groupe des souris non traitées (CTRL) à partir de J14 post infection. Dans l'ensemble, les résultats obtenus au cours de notre essai sont comparables à ceux obtenus aux essais précédents réalisés par notre équipe puisque nous avons observé le même niveau de colonisation et une durée équivalente dans le groupe contrôle. Au pic de l'infection (J2 post-infection), bien que les souris soient colonisées, elles ont présenté une activité normale avec des selles molles à diarrhéiques. Nous avons également remarqué au sein du laboratoire que selon la souche utilisée (R20291 ou 630) les signes cliniques pouvaient être plus ou moins sévères et l'évolution plus ou moins fatale notamment avec la souche R20291. De plus, si on compare ces observations à celles rapportées par Chen *et al.*, ce dernier avait observé des signes cliniques plus importants (Chen *et al.*, 2008). Dans cette étude, les souris avaient été gavées par la souche virulente VPI 10463 de *C. difficile*, décrite comme plus virulente que la souche 630 Δ erm de *C. difficile* que nous avons utilisée. Par conséquent, nos observations sont cohérentes et la sévérité de l'infection est bien différente selon la souche de *C. difficile* utilisée. Il semble important de considérer ces paramètres lors de la comparaison des études. Par ailleurs, avec un modèle d'infection chez la souris par la clindamycine, dans lequel les souris ont été infectées par les spores de la souche 630 Δ erm de *C. difficile*, il a été observé une clairance à J10 pour certaines souris et à J6 pour d'autres (Lesniak *et al.*, 2021). Il est donc également important de considérer la forme sous laquelle la bactérie est administrée qui semble également impacter la cinétique de clairance. Les études ayant utilisé le modèle céfopérazone comme inducteur de dysbiose, ont observé une sévérité plus importante de l'infection avec une clairance plus lente après l'infection comparativement au modèle de Chen *et al.* ou à ce que nous avons pu observer (Reeves *et al.*, 2011). Globalement, nos résultats observés et les données de la littérature suggèrent que la sévérité de l'infection par *C. difficile* et son évolution dans un modèle souris, dépend du type de dysbiose induite, de la souche utilisée et de la nature de l'inoculum (spores ou cellules végétatives). Du fait du faible taux/absence de mortalité mais avec une colonisation effective, notre modèle semble tout à fait adéquat pour suivre sur une longue période la colonisation et la clairance naturelle de *C. difficile* mais aussi d'évaluer l'impact des différents antibiotiques et d'une ou plusieurs réinfections sur l'évolution de l'infection.

- **Quel est l'impact des antibiotiques sur la cinétique de clairance de *C. difficile* ?**

Nous avons pu montrer avec notre modèle que la clairance de *C. difficile* survient naturellement au bout de 14 jours post-infection sans traitement. Une brève exposition aux différents antibiotiques utilisés a montré des effets différents sur la colonisation digestive par *C. difficile*. Avec la vancomycine et la fidaxomicine, nous avons observé une diminution importante et précoce des formes végétatives détectables de *C. difficile*. L'analyse par qPCR avec des amorces spécifiques ciblant l'ADNr 16S de *C. difficile* sur les échantillons d'ADN génomique total et l'ADN total des formes sporulées a montré une augmentation du nombre de copies de forme

sporulée de *C. difficile* à l'arrêt du traitement. Outre les spores, nous avons également détecté des formes végétatives de *C. difficile* non détectables par la méthode de culture sur gélose. Par conséquent, la persistance des spores et des formes végétatives non détectables par la méthode de culture pourrait être à l'origine de la recolonisation précoce observée après l'arrêt de la brève exposition aux antibiotiques de traitement de *C. difficile*. Ces premières analyses soulignent également l'importance de conduire le traitement jusqu'à son terme et posent la question du délai à partir duquel on considère que le pathogène est totalement éliminé. En complément, il serait intéressant de réaliser ces analyses de q-PCR ADN total/ADN sporulés sur d'autres points de la cinétique.

Cependant, l'ensemble de ces données reflètent uniquement les points finaux détectables dans les selles prélevées. Que se passe-t-il dans le tube digestif durant la traversée de *C. difficile* depuis l'ingestion jusqu'à la production des toxines et l'apparition des signes cliniques de l'infection ?

Une étude réalisée en 2014 dans un modèle céfopérazone a suivi la colonisation par les spores de la souche VPI 10463 de *C. difficile* pendant 36 heures dans les différents compartiments du tube digestif à savoir l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin, le côlon et le cæcum (Koenigsnecht *et al.*, 2015). Les auteurs ont détecté des formes végétatives de *C. difficile* au bout de 6 heures dans le cæcum, le côlon et les selles, suggérant la germination rapide de ces spores dès 6 heures après l'inoculation. Ils ont également montré une augmentation des formes végétatives au cours du temps tout au long du tube digestif avec une sporulation plus importante dans l'estomac, le cæcum, le côlon et les selles en comparaison de l'intestin grêle à partir de 24 heures post-infection. De plus, les auteurs ont montré une production de toxines à partir de 24 heures post-infection à des taux plus élevés dans le cæcum, le côlon et les selles, suggérant un lien entre la production de toxines et la sporulation (Koenigsnecht *et al.*, 2015). Dans l'ensemble, les auteurs ont pu établir l'évolution des spores de *C. difficile* dans le tube digestif jusqu'à la production des toxines responsables des signes cliniques de l'infection à 36 heures.

Il serait ainsi intéressant d'évaluer la cinétique dans les différents compartiments du tube digestif avec notre modèle, les selles n'étant pas le reflet exact de ce qui se passe dans les différents compartiments du tube digestif. De même, la discordance entre l'absence de détection dans les selles et la persistance digestive haute soulève l'hypothèse d'un mode de survie sous forme sporulée dans une niche écologique au niveau du mucus ou à l'intérieur d'un biofilm constitué. La dysbiose obtenue avec les différents modèles de dysbiose étant différente, il est ainsi probable que les résultats obtenus soient différents et puissent nous éclairer sur les différentes cinétiques possibles en fonction des dysbioses initiales permettant ainsi de mieux comprendre l'issue des infections et potentiellement prévoir les récurrences.

- **La cinétique de la colonisation digestive par *C. difficile* est-elle différente au fur et à mesure des réinfections ?**

Contrairement à d'autres études sur la physiopathologie de l'ICD chez la souris, nous avons introduit une étape de réinfection à partir du jour 31 (J31) post-infection. Toutes les souris ont à nouveau été infectées suite au même protocole initial d'induction d'une dysbiose, par la souche 630 Δ erm de *C. difficile* sans de nouveau exposer à la vancomycine, à la fidaxomicine ou au métronidazole. Nos résultats ont montré que les souris étaient de nouveau colonisées à la même hauteur que lors de la première infection. Par ailleurs, nous avons observé une clairance plus rapide des formes végétatives détectables à partir de 5 à 7 jours selon les groupes comparativement à la première infection où la clairance était observée à partir de 14 jours dans le groupe contrôle. Ceci suggère la présence d'éléments (réponse immune, résistance du microbiote) favorisant une clairance plus rapide au second contact avec la bactérie. De plus, dans le groupe R de réinfections multiples par la même souche, nous avons observé une clairance des formes végétatives détectables plus rapide après chacune des 3 réinfections et une absence de signes cliniques à partir de la troisième réinfection.

Dans notre modèle d'infection et de réinfection, il est cependant difficile de décorrélérer la rechute et la réinfection car une souche identique a été utilisée. Pour contourner ce problème, il serait intéressant pour les prochaines expérimentations animales comportant un protocole de réinfection, d'inoculer les souris avec des souches de *C. difficile* marquées par exemple avec des gènes de résistance pour discriminer les deux souches en réalisant soit des PCR soit des cultures compétitives sur des géloses sélectives.

- **Quelle forme de *C. difficile* est responsable des récurrences ?**

Nous avons montré qu'en traitant à nouveau les souris selon le protocole de Chen *et al.*, dans le but de reconduire un nouveau protocole infectieux chez les souris survivantes, nous avons en réalité induit une rechute attestée par la détection de *C. difficile* par qPCR à J37. Ces résultats suggèrent qu'après un protocole infectieux, malgré la négativation des formes végétatives de *C. difficile* par culture dans les selles et en enrichissement, ce dernier persisterait au niveau du tube digestif. Toutefois, la culture sur boîte des selles à J37, n'a pas été réalisée, il faut donc être vigilant et à minima intégrer une numération sur gélose pour s'assurer de l'absence de *C. difficile* avant une nouvelle infection.

On peut émettre l'hypothèse que la persistance de *C. difficile* soit sous forme de spores, de biofilms ou de spores dans un biofilm mono-espèce ou multi-espèces. En effet, il a été montré *in vitro*, que les antibiotiques peuvent induire la formation de biofilms de *C. difficile* conférant ainsi une tolérance aux antibiotiques (Frost *et al.*, 2021).

De plus, quelques études ont montré que *C. difficile* pouvait persister sous forme de biofilm mono-espèces ou multi-espèces dans la couche externe du mucus de la souris (Semenyuk *et al.*, 2015; Soavelomandroso *et al.*, 2017). Il serait ainsi intéressant de pouvoir réaliser une expérimentation incluant des prélèvements de différentes sections du tube digestif qui pourraient être marquées et observées en microscopie. Parmi les marquages il faudrait notamment considérer un marquage des cellules végétatives et un marquage spécifique des spores. De plus, des marquages histologiques spécifiques pourraient être intéressants pour observer les colocalisations de *C. difficile* par rapport aux mucines de la couche de mucus et aux cellules épithéliales.

Pour discriminer entre l'hypothèse spores ou biofilms, on pourrait envisager d'infecter les souris avec une souche déficiente dans la sporulation afin de voir si on observe le même phénomène de rechute ou pas. Il a été montré qu'un mutant *spo0A* dans les souches 630 et R20291 ne sporule pas (Deakin *et al.*, 2012) pouvant au premier abord être un bon candidat à envisager.

Dans un modèle clindamycine de colonisation et d'infection par *C. difficile* chez la souris, il a été montré qu'une souche R20291 muté pour *spo0A* était plus virulente que la souche sauvage. Cette virulence accrue a été associée à la production importante de toxines TcdA et TcdB de *C. difficile*. Malgré cela, ces souches ne persistent pas chez l'hôte et ne sont pas capables de transmettre le pathogène, suggérant le rôle important de Spo0A dans la persistance et la transmission de *C. difficile*. En effet, après un traitement pulsé par la vancomycine, il a été observé une rechute chez les souris infectées par la souche sauvage. En revanche, ce phénomène de rechute n'a pas été détecté chez les souris infectées par la souche mutée pour *spo0A* pour laquelle *C. difficile* n'était plus détectable après le premier traitement (Deakin *et al.*, 2012). Ces données suggèrent un rôle primordial de la sporulation dans la rechute. Une autre étude a quant à elle montré que la mutation de *spo0A* réduit la formation de biofilm par *C. difficile* en planctonique (Dawson *et al.*, 2012). Cependant, le mécanisme à l'origine de l'inhibition de la formation du biofilm par une souche muté pour *spo0A* reste à déterminer. Ensemble, ces données suggèrent qu'une mutation du gène *spo0A* a effet une pléiotropie sur *C. difficile*, par conséquent, il ne serait pas un bon candidat pour discriminer entre l'hypothèse de spores et celle du biofilm pour la persistance de *C. difficile*. Il serait donc nécessaire de pouvoir muter un autre facteur impliqué dans la sporulation mais qui n'impacterai pas la formation de biofilm. On pourrait ainsi envisager une mutation d'un régulateur de la sporulation avec un effet moins étendu que celui de Spo0A donc en aval de la cascade de régulation débuté par Spo0A.

3. La réponse immune adaptative

- **La mise en place de la réponse immune adaptative est-elle comparable à d'autres modèles d'étude ?**

Dans nos précédents essais au sein de l'équipe, nous avons utilisé la technique de l'ELISA indirect qui a certains inconvénients comme la saturation de la réponse sur la base de la densité optique (DO) en dehors de la zone de linéarité de la spectrophotométrie. Une autre limite de l'ELISA indirect sur la base de la DO est l'absence de comparabilité des résultats de différents essais puisque qu'ils ne sont pas normalisés. Afin de s'affranchir de ces limites, nous avons mis au point la technique de l'ELISA quantitatif pondéral.

En utilisant l'ELISA quantitatif pondéral, nous avons observé une augmentation de la réponse IgG anti-TcdA dans les groupes exposés aux antibiotiques en comparaison du groupe contrôle après la première infection. Les résultats obtenus suggèrent que la persistance de *C. difficile* suite à la recolonisation précoce observée dans les groupes vancomycine et fidaxomicine, a conduit à un deuxième contact entre la bactérie et le système immunitaire, comme en atteste la reprise des signes cliniques qui s'étaient amendés après les deux jours d'exposition aux antibiotiques. Ce second contact peut expliquer la meilleure réponse d'IgG anti-TcdA observé à J21 dans ces groupes exposés aux antibiotiques en comparaison du groupe CTRL. A la suite de la réinfection, qu'elle soit simple dans les groupes contrôle, vancomycine, métronidazole, fidaxomicine ou multiple, dans le groupe R, nous avons observé une réponse équivalente d'IgG dirigée contre les toxines dans tous les groupes indiquant un effet plafond quel que soit le nombre de contact avec la bactérie. Ces observations ont également été faites dans le cadre de la Covid-19 avec le vaccin Pfizer, où des patients ayant déjà infectés par le SARS-CoV-2 ont une réponse immune humorale qui atteint un plafond à la suite de deux doses du vaccin Pfizer en comparaison des patients qui n'ont jamais eu la Covid-19 (Pean De Ponfilly *et al.*, 2021). Très peu d'études ont cependant évalué la mise en place de la réponse immune dirigée contre les toxines de *C. difficile* dans un modèle de colonisation et d'infection chez la souris. On peut néanmoins citer l'étude de van Opstal *et al.* au cours de laquelle des souris prétraités par le cocktail de Chen *et al.*, ont été infectées et traitées pendant 5 jours par la vancomycine 24 heures post-infection. Les auteurs ont observé que les taux d'IgG et IgA sériques étaient significativement plus faibles dans le groupe vancomycine que dans le groupe non traité peu importe l'âge de la souris (van Opstal *et al.*, 2016). De plus, Griffin *et al.*, ont montré que les souris C57BL/6 infectées par *Salmonella Thyphimurium* et traitées pendant cinq semaines en eau de boisson par l'enrofloxacin, un dérivé de fluoroquinolone, avaient une réponse immune adaptative faible de même que les cellules productrices de l'INF- γ impliquées dans la réponse du type Th1 en comparaison des souris immunisées (Griffin *et al.*, 2009). En considérant l'ensemble de ces données, la principale différence entre ces deux études et la nôtre est que

le traitement a été conduit dans un contexte curatif et non une stimulation de l'infection comme nous l'avons fait. Ceci pourrait expliquer la différence des résultats obtenus dans ces études comparativement à notre étude. On peut émettre l'hypothèse que la brève exposition aux antibiotiques dans notre modèle pourrait ne pas avoir été suffisante pour induire une réponse immunomodulatrice mais aurait en revanche favorisé une meilleure réponse contre l'infection. Il serait intéressant de refaire l'expérimentation en conduisant un protocole de traitement curatif adéquat afin de confirmer ou non ces observations.

- **Pourquoi la réponse IgG anti-TcdB détectable est-elle plus faible que la réponse anti-TcdA ?**

Contrairement à la réponse IgG anti-TcdA, la réponse IgG anti-TcdB n'était pas détectable dans les sérums 21 jours après la première infection. Cependant, après une deuxième infection dans le protocole du groupe R, nous avons pu détecter une réponse IgG anti-TcdB à J21, bien qu'elle soit toujours plus faible par rapport à celle de TcdA. En effet, dans nos essais précédents, bien que l'analyse de la réponse soit faite par ELISA indirect non quantitatif, nous avons déjà remarqué que les titres d'IgG produites contre TcdB étaient plus faibles en comparaison des titres d'IgG anti-TcdA. Les déterminants à l'origine de cette faible réponse immune adaptative dirigée contre TcdB en modèle de colonisation et d'infection chez la souris reste à préciser.

Nous avons vu au cours de la revue bibliographique que la production des anticorps spécifiques des antigènes du pathogène dépend généralement des cellules T CD4+ et que celle-ci est modulée par les cytokines qui sont produites. Une récente étude dans un modèle de souris prétraitées par la céfopérazone a montré que l'infection par *C. difficile* induit la production d'IgM sériques et d'IgA mucosales dirigées contre TcdB. De plus, tout comme nous l'avons observé, la réponse IgG dirigée contre TcdB était faible, suggérant que l'infection n'a pas favorisé une commutation de classe isotypique efficace entre les IgM et les IgG (Amadou Amani *et al.*, 2020). Il est donc possible que ce même phénomène puisse expliquer nos résultats. De plus, les auteurs ont montré que les IgM et les IgA anti-TcdB produites après la première infection, n'ont pas eu d'effet neutralisant sur la toxine B et que par conséquent ils n'ont pas conféré de protection contre la réinfection (Amadou Amani *et al.*, 2020). Les auteurs ont également montré que l'infection par *C. difficile* induit une expansion clonale partielle des cellules T helper et des cellules B mémoires spécifiques de TcdB. Ceci serait donc à l'origine de la faible production d'anticorps dirigés contre la toxine B après l'infection par *C. difficile*. Le mécanisme par lequel TcdB induit une expansion clonale partielle des cellules T et B reste à déterminer. D'autre part, les auteurs ont montré que l'inoculation d'une dose importante de spores a induit une meilleure réponse IgG. Ils ont émis l'hypothèse que la sévérité de l'infection ou l'accessibilité de la toxine au système immunitaire est déterminante pour la production de ces anticorps (Amadou Amani *et al.*, 2020). Ces données semblent être en accord avec nos

résultats puisque nous avons observé une réponse IgG anti-TcdB seulement après une réinfection. Un nouvel essai incluant la mesure de la quantité de lymphocytes T, de cellules B mémoires spécifiques de TcdB mais aussi de TcdA et la détection des différentes cytokines impliquées dans la modulation de la réponse cellulaire et dans la réponse humorale lors de l'infection par *C. difficile* pourrait permettre de mieux caractériser la mise en place de la réponse IgG dirigée contre TcdB. De plus, cela permettrait de mieux comprendre leur rôle dans les récurrences. En effet, il a été montré qu'un taux faible d'IgG anti-TcdB était associé à la survenue d'une récurrence (Bauer *et al.*, 2014).

- **Les anticorps produits ont-ils un effet neutralisant sur l'activité cytotoxique des toxines ?**

Des études ont montré que les anticorps produits contre les toxines ont un pouvoir neutralisant sur leur activité cytotoxique en particulier les IgA sériques de la sous classe 1 (IgA1) sur la toxine A (Viscidi *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1995). Nous avons montré dans notre modèle que suite à la réinfection, les souris étaient toutes de nouveau colonisées mais ne présentaient que très peu, voire pas, de signes cliniques en comparaison de ce qui était observé suite à la première infection. Ces données suggèrent que les anticorps produits lors de la première infection auraient un pouvoir neutralisant sur les toxines et donc confèreraient une protection contre une nouvelle infection. Une des perspectives à court terme de ce travail sera d'évaluer le pouvoir neutralisant des anticorps sériques et mucosaux détectés sur les cellules Vero en utilisant le protocole décrit dans l'article sur la production et purification des toxines recombinantes. Ces données pourront confirmer si l'absence de signes cliniques observés est corrélée aux anticorps sériques produits (taux et pouvoir neutralisant). Cependant, compte tenu du volume de sérums restant et ceux nécessaires pour ce type de test de neutralisation, tous les échantillons ne pourront pas être testés. En effet, une des limites du modèle souris est la quantité de matériel biologique collecté.

- **Comment expliquer l'absence de réponse IgA mucosale ?**

Il a été montré que les IgA sécrétoires jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections au niveau de la muqueuse intestinale (Mantis *et al.*, 2011). Toutefois, très peu d'études ont étudié leur rôle dans les ICD. Dans notre étude, nous avons donc souhaité détecter les IgA mucosales dans les eaux caecales préparées à partir des contenus caecaux à l'arrêt de l'essai à J51 (soit 14 jours après la réinfection). Les résultats de l'ELISA quantitatif pondéral ont montré que nous avons détecté des IgA spécifiquement dirigées contre les deux toxines dans des eaux caecales. Cependant, les concentrations obtenues étaient beaucoup plus faibles par rapport aux IgG sériques et ce quel que soit les groupes et quelle que soit le type de réinfection, simple ou multiple. Au cours de notre essai, nous nous sommes placés au 14^{ème} jour post-réinfection. Il a été montré que les IgA sécrétoires produites ont une demi-vie relativement

courte (4-7 jours) comparativement aux IgG (van Tetering *et al.*, 2020). En effet, l'objectif est que ces IgAs s'agglomèrent avec leur cible, ici les toxines et probablement les bactéries, dans le but d'être éliminées rapidement du tractus digestif avec les selles (Mantis *et al.*, 2011). Considérant leur courte demi-vie, il semble que nous n'étions pas dans la fenêtre temporelle optimale nous permettant d'étudier la réponse IgA mucoale dirigée contre les toxines. Nous avons toutefois essayé de détecter les IgA dans une solution de selles diluée qui avait été conservée à -80°C. De la même manière qu'avec les eaux caecales, la détection était relativement faible. L'échantillonnage n'étant pas optimal, il est difficile de conclure sur ces résultats. Une nouvelle expérimentation avec des sacrifices à des temps précoces serait plus adaptée pour la détection dans le contenu cæcal. Il est également possible de réaliser des prélèvements de selles fraîches à des temps rapprochés de la phase aiguë de l'infection qui seront traités directement pour la détection des IgA fécales.

- **Comment expliquer l'absence de réponse immunitaire adaptative dirigée contre SlpA et FliC dans notre modèle ?**

Enfin, dans le cadre de cette thèse nous souhaitions initialement évaluer la réponse immunitaire adaptative contre les protéines de surface SlpA et FliC pour lesquelles des essais d'immunisation active et passive chez le hamster et chez la souris ont montré des effets sur la diminution de la colonisation par *C. difficile* (O'Brien *et al.*, 2005; Ní Eidhin *et al.*, 2008; Bruxelles *et al.*, 2016). De plus, chez l'Homme des anticorps spécifiquement dirigés contre ces protéines de surface ont été détectés chez des patients convalescents. Ainsi, ces deux protéines représentent de bons candidats vaccins visant à limiter le processus de colonisation digestive par *C. difficile*.

Au cours des différents essais en modèle souris réalisés au sein de notre équipe, il a été observé une réponse IgM contre SlpA et FliC mais paradoxalement pas de réponse IgG, comparativement aux toxines. Plusieurs hypothèses ont été avancées quant à l'absence de la réponse immunitaire adaptative IgG contre ces deux protéines. Une des hypothèses était qu'un second contact avec *C. difficile* était nécessaire pour l'induction d'une réponse IgG anti-SlpA et anti-FliC. L'introduction d'une réinfection dans notre protocole devait permettre de tester cette hypothèse. Contrairement aux toxines, pour lesquelles une réponse d'IgG a été détectée, aucune réponse IgG n'était détectable contre SlpA et FliC dans le sérum des souris infectées à J51 à l'arrêt de l'essai.

Une autre hypothèse avancée pour expliquer l'absence de la réponse contre ces deux protéines de surface pourrait être que la quantité de SlpA ou de FliC présentée aux cellules effectrices de l'immunité adaptative serait insuffisante ou que ces macromolécules ne seraient pas disponibles. Dans l'optique d'améliorer l'accessibilité des antigènes, nous avons choisi d'infecter les souris par *C. difficile* puis les exposer brièvement aux antibiotiques ciblant *C.*

difficile tels la vancomycine, la fidaxomicine et le métronidazole. Aucune réponse IgG n'a été détectée contre SlpA ni FliC dans ces conditions suggérant qu'une seule exposition au pathogène suivi d'un traitement antibiotique ne soient pas suffisante pour obtenir une réponse immune contre ces facteurs.

Durant mes travaux nous avons également simulé des contacts répétés avec le pathogène dans le groupe à réinfection multiple (groupe R). Dans ces conditions, nous n'avons toujours pas été en mesure de détecter des anticorps contre SlpA ni contre FliC.

Considérant l'ensemble de ces observations nous avons émis l'hypothèse que les anticorps dirigés contre ces facteurs pouvaient ne pas être détecté par notre méthode ELISA avec les antigènes utilisés. En effet, il a été montré que la sous-unité LMW (*Low Molecular Weight*) de SlpA représente la sous-unité immunogène de SlpA. Nos essais ELISA ont été réalisés avec le précurseur SlpA complet regroupant à la fois la LMW et la HMW. Il est ainsi possible que l'épitope reconnu par les anticorps éventuellement présents dans les sérums ne soit pas accessible. Nous nous sommes donc procuré la sous-unité LMW de SlpA auprès de notre collaboratrice Delphine Sterlin (CHU La Pitié Salpêtrière) et avons réalisé des essais ELISA avec cet antigène. Il n'a une nouvelle fois pas été possible de détecter les IgG sériques et des IgA mucosales contre la sous-unité LMW de SlpA dans les sérums des groupes testés.

Lors de notre expérimentation, nous avons collecté les plaques de Peyer et la rate des souris infectées par *C. difficile* à l'arrêt de l'essai à J51. Ces échantillons nous ont permis de réaliser un test ELISPOT. Le nombre de cellules productrices d'immunoglobulines contre la sous-unité LMW de SlpA ou FliC étaient significativement faibles dans les échantillons testés. Parmi ces échantillons, nous avons également inclus le groupe des souris exposées pendant jours consécutifs à la céfoxitine, un antibiotique non actif contre *C. difficile* mais qui perturbe fortement le microbiote digestif. L'objectif était de stimuler un signal de stress utile pour optimiser la mise en place d'une réponse contre ces protéines de surface.

En conclusion, l'infection et la réinfection simple ou multiple par *C. difficile* en modèle souris ne semblent pas suffisantes pour induire une réponse immune adaptative anti-SlpA, anti-LMW de SlpA ni d'anti-FliC ce qui semble différent de ce que l'on observe chez l'Homme.

Il semblerait donc que, tout comme pour TcdB, l'infection par *C. difficile* ne favoriserait pas l'expansion clonale optimale des cellules T helper et les cellules B mémoires spécifiques de SlpA, ni de sa sous-unité LMW, ni de FliC. D'autre part, il est également possible que l'affinité de liaison spécifique entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques présentatrices de ces molécules ne soit pas optimale.

4. La modulation du microbiote digestif au cours de l'infection

Au cours de ces travaux, en utilisant l'approche du profilage du microbiote par le séquençage de la région V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S, nous avons montré que le modèle murin de dysbiose que nous avons utilisé est cohérent avec les données de la littérature. Ainsi, on observe bien une diminution des Firmicutes et des Bacteroidetes ainsi qu'une augmentation des Protéobactéries dont les *Enterobacteriaceae* et en particulier les genres *Escherichia-Shigella* attestant de la dysbiose (Reeves *et al.*, 2011; Buffie *et al.*, 2012; Lesniak *et al.*, 2021). Nos résultats semblent montrer que les antibiotiques d'intérêt clinique ont des effets additionnels spécifiques sur le microbiote avec un effet plus important de la vancomycine en comparaison de la fidaxomicine et du métronidazole. Cependant, il est à noter que les résultats présentés pour le microbiote proviennent d'une analyse préliminaire, il sera nécessaire de finaliser ces analyses afin de consolider les résultats observés et de mieux comprendre les perturbations induites par la vancomycine, la fidaxomicine et le métronidazole sur le microbiote.

- Quel est l'impact de la céfoxitine sur le microbiote ?

Au cours de cet essai, nous avons également inclus un groupe exposé à la céfoxitine (groupe FOX), un antibiotique non actif contre *C. difficile* mais ayant un impact potentiellement important sur le microbiote digestif. L'objectif de ce groupe est de voir si la réponse immunitaire obtenue est due à un effet indirect de déstabilisation d'autres bactéries du microbiote intestinal générant ainsi un signal de stress susceptible d'augmenter la réponse de l'hôte.

De façon surprenante, nous avons observé avec la céfoxitine les mêmes effets sur la colonisation que ceux observés avec le métronidazole. Nous nous attendions à observer une clairance naturelle comme dans le groupe contrôle sans effet rebond sur la colonisation comme dans le groupe métronidazole. De même, nous avons observé une réponse immunitaire adaptative spécifique dirigée contre les toxines de *C. difficile* comparable au groupe métronidazole. Notre hypothèse est qu'il existe une potentielle interaction avec les bactéries du microbiote impliquées dans la clairance de *C. difficile*. Nous disposons des échantillons de selles de souris exposées à la céfoxitine qui pourraient être utilisés pour une analyse du microbiote afin d'investiguer cette hypothèse. Ces échantillons pourraient nous renseigner sur les genres bactériens impactés par la brève exposition à la céfoxitine mais aussi les comparer à ceux impactés par les autres antibiotiques.

- **Y'a-t-il des marqueurs corrélés à la clairance de *C. difficile* ?**

Dans une perspective à court terme, nous allons réaliser une analyse approfondie de nos données afin d'identifier les genres bactériens pouvant être corrélés négativement ou positivement à la colonisation par *C. difficile* dans les différentes conditions testées au cours de cet essai. Ces données pourront également être comparées à celles issues d'une cohorte de patients ICD traités par les différents antibiotiques (en cours de recrutement). Berkell *et al.* ont en effet montré que des genres bactériens pouvaient être prédictifs du développement de l'infection par *C. difficile*. En particulier, les patients ayant développé une ICD avaient une diversité microbienne plus faible avant traitement antibiotique comparé aux patients non ICD et que leur microbiote était enrichi en *Enterococcus* mais appauvri en *Blautia*, *Ruminococcus*, *Prevotella* et Bifidobactéries (Berkell *et al.*, 2021). Comme le profilage par ADNr 16S ne permet pas d'aller jusqu'à l'espèce, il serait également possible de rechercher spécifiquement par qPCR des espèces d'intérêt mises en évidence après l'analyse des données et une comparaison avec celle de la littérature. Nous disposons par exemple au laboratoire d'amorces spécifiques permettant l'amplification de certaines Bifidobactéries.

5. Existe-il une corrélation entre la modulation du microbiote digestif au cours de l'infection et la réponse immunitaire adaptative ?

Au cours de la revue bibliographique, nous avons montré que le microbiote intestinal intervient dans la maturation du système immunitaire et dans la stimulation de la biosynthèse des immunoglobulines A sécrétoires pour renforcer les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, inhiber l'adhésion des microorganismes et neutraliser l'activité cytotoxique des toxines. Il serait intéressant d'évaluer dans notre modèle d'étude s'il est possible de corréler nos résultats de réponse immunitaire (taux d'IgG anti-toxines) à ceux de microbiote (liste des OTU différentiels). Pour cela, nous pourrions utiliser une analyse en composante principale (ACP).

CONCLUSION

Conclusion

Mes travaux de thèse sur l'impact des antibiotiques sur la colonisation digestive par *C. difficile* et sur la modulation de la réponse immune adaptative et du microbiote digestif lors de l'infection ont permis de mettre en évidence la variabilité de la réponse aux traitements antibiotiques actifs contre *C. difficile*. Nous avons montré qu'une brève exposition à la vancomycine et la fidaxomicine n'a pas été en mesure de complètement éliminer *C. difficile*, ce qui a eu pour conséquence d'induire une recolonisation/réinfection précoce à partir des spores et/ou des formes végétatives non détectables par la culture. Comparativement à ces deux antibiotiques, le métronidazole n'a eu peu ou pas d'effet sur la colonisation digestive par *C. difficile*. L'analyse de la réponse immune adaptative par la technique ELISA quantitative pondérale mise au point durant ce travail a permis de mettre en évidence une différence dans la mise en place de la réponse immune adaptative après la première infection. Nous avons observé une réponse plus précoce et des taux plus élevés d'anticorps sériques anti-toxines pour les groupes exposés brièvement aux antibiotiques. Nos résultats ont montré que la persistance de la colonisation améliore la réponse immune dirigée contre les toxines, probablement du fait d'une exposition prolongée aux toxines. Nous avons également montré que les taux d'anticorps anti-toxines sériques (IgG) produits sont équivalents quels que soient les groupes après une ou plusieurs réinfections. Ainsi, le contact prolongé et répété avec *C. difficile* amène à une réponse plus précoce et plus importante jusqu'à l'observation d'un plafond de réponse. Il serait par ailleurs intéressant d'évaluer la durée de ce plafond de réponse dans le temps et donc la durée de la réponse mémoire protectrice.

Nous avons débuté l'analyse du microbiote qui sera consolidé par des analyses différentielles, ce qui nous permettra de caractériser plus en détail l'impact sur le microbiote des différents antibiotiques d'intérêt clinique.

Enfin, en ce qui concerne les acides biliaires, nous avons débuté le développement de la méthode de dosage de ces acides biliaires dans les selles par UHPLC-ESI-MS (Exactive Plus, Orbitrap). Il sera nécessaire de finaliser le développement de cette méthode en incluant une courbe d'étalonnage et en la validant sur de nouveaux échantillons notamment ceux provenant des différents compartiments du tube digestif (estomac, intestin grêle, côlon et contenu caecal). Son adaptation aux spécificités des acides biliaires chez l'Homme sera la dernière étape. Une fois la méthode développée, nous pouvons corrélérer à la mise en place et l'évolution de l'infection par *C. difficile* dans le tube digestif à la fois chez la souris et chez l'Homme.

Dans l'ensemble, nos résultats chez la souris montrent que la réponse de l'hôte face à l'ICD est influencée par plusieurs facteurs qui doivent être pris en considération lors de la prédiction de l'issue de l'infection et dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans le meilleur des cas, il serait intéressant de refaire l'expérience et de collecter des échantillons de selles en quantité suffisante permettant de suivre à la fois la colonisation par *C. difficile*, analyser le profil des acides biliaires de même que la modulation du microbiote digestif. Avec des prélèvements de sang et de selles faits le même jour, nous pourrions également déterminer la modulation de la réponse immunitaire adaptative sérique et muqueuse afin de corréler tous les facteurs qui sont en faveur ou non de la colonisation par *C. difficile*. Cependant, les études possibles à ce jour chez la souris se limitent à l'étude de l'un ou l'autre de ces facteurs notamment du fait de la faible quantité de matériel biologique accessible chez cet animal. Il faudrait donc soit optimiser les techniques de détection pour utiliser moins de matériel soit utiliser un autre modèle animal.

En conclusion, ces résultats dans le modèle de colonisation et d'infection par *C. difficile* chez la souris offrent des perspectives d'études prometteuses. Il serait très intéressant d'inclure le suivi de la réponse immunitaire adaptative, du microbiote intestinal et des acides biliaires dans une cohorte ultérieure de patients présentant une colonisation asymptomatique, des patients présentant un seul épisode d'ICD, des patients avec une ou plusieurs récurrences et des patients non colonisés par *C. difficile* au moment de l'essai pour l'analyse comparative. Une telle cohorte est actuellement en cours de recrutement au sein de l'équipe de recherche. Les outils que j'ai pu mettre en place durant cette thèse pourront contribuer à l'analyse des échantillons collectés au cours de cette cohorte et les résultats obtenus confrontés à mes travaux sur modèle souris.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K.M., Ganu, R., Petrosino, J., Versalovic, J., 2014. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci. Transl. Med.* 6, 237ra65-237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Aagaard, K., Riehle, K., Ma, J., Segata, N., Mistretta, T.-A., Coarfa, C., Raza, S., Rosenbaum, S., Veyver, I.V. den, Milosavljevic, A., Gevers, D., Huttenhower, C., Petrosino, J., Versalovic, J., 2012. A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. *PLOS ONE* 7, e36466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036466>
- Adak, A., Khan, M.R., 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Adams, C.M., Eckenroth, B.E., Putnam, E.E., Doublé, S., Shen, A., 2013. Structural and functional analysis of the CspB protease required for *Clostridium* spore germination. *PLoS Pathog.* 9, e1003165. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003165>
- Ajami, N.J., Cope, J.L., Wong, M.C., Petrosino, J.F., Chesnel, L., 2018. Impact of Oral Fidaxomicin Administration on the Intestinal Microbiota and Susceptibility to *Clostridium difficile* Colonization in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62. <https://doi.org/10.1128/AAC.02112-17>
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Aktories, K., Lang, A.E., Schwan, C., Mannherz, H.G., 2011. Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *FEBS J.* 278, 4526–4543. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08113.x>
- Alasmari, F., Seiler, S.M., Hink, T., Burnham, C.-A.D., Dubberke, E.R., 2014. Prevalence and risk factors for asymptomatic *Clostridium difficile* carriage. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 59, 216–222. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu258>
- Allegretti, J.R., Kearney, S., Li, N., Bogart, E., Bullock, K., Gerber, G.K., Bry, L., Clish, C.B., Alm, E., Korzenik, J.R., 2016. Recurrent *Clostridium difficile* infection associates with distinct bile acid and microbiome profiles. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43, 1142–1153. <https://doi.org/10.1111/apt.13616>
- Allegretti, J.R., Marcus, J., Storm, M., Sitko, J., Kennedy, K., Gerber, G.K., Bry, L., 2020. Clinical Predictors of Recurrence After Primary *Clostridioides difficile* Infection: A Prospective Cohort Study. *Dig. Dis. Sci.* 65, 1761–1766. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05900-3>
- Allen, S.J., Wareham, K., Wang, D., Bradley, C., Hutchings, H., Harris, W., Dhar, A., Brown, H., Foden, A., Gravenor, M.B., Mack, D., 2013. Lactobacilli and Bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet* 382, 1249–1257. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61218-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61218-0)

- Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M., Strozzi, F., Beracochea, M., Shi, Z.J., Pollard, K.S., Sakharova, E., Parks, D.H., Hugenholtz, P., Segata, N., Kyrpides, N.C., Finn, R.D., 2021. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 39, 105–114. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0603-3>
- Amadou Amani, S., Shadid, T., Ballard, J.D., Lang, M.L., 2020. *Clostridioides difficile* Infection Induces an Inferior IgG Response to That Induced by Immunization and Is Associated with a Lack of T Follicular Helper Cell and Memory B Cell Expansion. *Infect. Immun.* 88, e00829-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00829-19>
- Ammam, F., Marvaud, J.-C., Lambert, T., 2012. Distribution of the vanG-like gene cluster in *Clostridium difficile* clinical isolates. *Can. J. Microbiol.* 58, 547–551. <https://doi.org/10.1139/w2012-002>
- Ammam, F., Meziane-Cherif, D., Mengin-Lecreux, D., Blanot, D., Patin, D., Boneca, I.G., Courvalin, P., Lambert, T., Candela, T., 2013. The functional *vanGCd* cluster of *Clostridium difficile* does not confer vancomycin resistance. *Mol. Microbiol.* 89, 612–625. <https://doi.org/10.1111/mmi.12299>
- Anderson, D.M., Sheedlo, M.J., Jensen, J.L., Lacy, D.B., 2020. Structural Insights into the Transition of *Clostridioides difficile* Binary Toxin from Prepore to Pore. *Nat. Microbiol.* 5, 102–107. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0601-8>
- Androga, G.O., Hart, J., Foster, N.F., Charles, A., Forbes, D., Riley, T.V., 2015. Infection with Toxin A-Negative, Toxin B-Negative, Binary Toxin-Positive *Clostridium difficile* in a Young Patient with Ulcerative Colitis. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3702–3704. <https://doi.org/10.1128/JCM.01810-15>
- Antonopoulos, D.A., Huse, S.M., Morrison, H.G., Schmidt, T.M., Sogin, M.L., Young, V.B., 2009. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infect. Immun.* 77, 2367–2375. <https://doi.org/10.1128/IAI.01520-08>
- Antunes, A., Camiade, E., Monot, M., Courtois, E., Barbut, F., Sernova, N.V., Rodionov, D.A., Martin-Verstraete, I., Dupuy, B., 2012. Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. *Nucleic Acids Res.* 40, 10701–10718. <https://doi.org/10.1093/nar/gks864>
- Antunes, A., Martin-Verstraete, I., Dupuy, B., 2011. CcpA-mediated repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression. *Mol. Microbiol.* 79, 882–899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07495.x>
- Antunes, L.C.M., Han, J., Ferreira, R.B.R., Lolić, P., Borchers, C.H., Finlay, B.B., 2011. Effect of antibiotic treatment on the intestinal metabolome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1494–1503. <https://doi.org/10.1128/AAC.01664-10>
- Arroyo, L.G., Rousseau, J., Willey, B.M., Low, D.E., Staempfli, H., McGeer, A., Weese, J.S., 2005. Use of a selective enrichment broth to recover *Clostridium difficile* from stool swabs stored under different conditions. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5341–5343. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5341-5343.2005>

- Assar, S., Nosratabadi, R., Khorramdel Azad, H., Masoumi, J., Mohamadi, M., Hassanshahi, G., 2021. A Review of Immunomodulatory Effects of Fluoroquinolones. *Immunol. Invest.* 50, 1007–1026. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1797778>
- Aubry, A., Hussack, G., Chen, W., KuoLee, R., Twine, S.M., Fulton, K.M., Foote, S., Carrillo, C.D., Tanha, J., Logan, S.M., 2012. Modulation of toxin production by the flagellar regulon in *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 80, 3521–3532. <https://doi.org/10.1128/IAI.00224-12>
- Avershina, E., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., Pope, P., Rudi, K., 2014. Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 280–290. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12223>
- Babakhani, F., Bouillaut, L., Gomez, A., Sears, P., Nguyen, L., Sonenshein, A.L., 2012. Fidaxomicin inhibits spore production in *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 55 Suppl 2, S162-169. <https://doi.org/10.1093/cid/cis453>
- Babakhani, F., Gomez, A., Robert, N., Sears, P., 2011. Killing kinetics of fidaxomicin and its major metabolite, OP-1118, against *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 60, 1213–1217. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.029470-0>
- Baban, S.T., Kuehne, S.A., Barketi-Klai, A., Cartman, S.T., Kelly, M.L., Hardie, K.R., Kansau, I., Collignon, A., Minton, N.P., 2013. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain. *PLoS One* 8, e73026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>
- Babcock, G.J., Broering, T.J., Hernandez, H.J., Mandell, R.B., Donahue, K., Boatright, N., Stack, A.M., Lowy, I., Graziano, R., Molrine, D., Ambrosino, D.M., Thomas, W.D., 2006. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. *Infect. Immun.* 74, 6339–6347. <https://doi.org/10.1128/IAI.00982-06>
- Bacci, S., Mølbak, K., Kjeldsen, M.K., Olsen, K.E.P., 2011. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 976–982. <https://doi.org/10.3201/eid1706.101483>
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 307, 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M.T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y.S., Kotowska, D., Colding, C., Tremaroli, V., Yin, Y., Bergman, S., Xu, X., Madsen, L., Kristiansen, K., Dahlgren, J., Wang, J., 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17, 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Bacon, A.E., Fekety, R., 1994. Immunoglobulin G directed against toxins A and B of *Clostridium difficile* in the general population and patients with antibiotic-associated diarrhea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 205–209. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0732-8893(94)90021-3)

- Baines, S.D., O'Connor, R., Saxton, K., Freeman, J., Wilcox, M.H., 2009. Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 520–525. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn502>
- Barbut, F., Gariazzo, B., Bonné, L., Lalande, V., Burghoffer, B., Luiuz, R., Petit, J.-C., 2007. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000-2004. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28, 131–139. <https://doi.org/10.1086/511794>
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M.R., Stiles, B.G., 2004. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 68, 373–402, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.373-402.2004>
- Barth, H., Pfeifer, G., Hofmann, F., Maier, E., Benz, R., Aktories, K., 2001. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J. Biol. Chem.* 276, 10670–10676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009445200>
- Bartlett, J.G., 1981. Antimicrobial agents implicated in *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea of colitis. *Johns Hopkins Med. J.* 149, 6–9.
- Bassères, E., Endres, B.T., Khaleduzzaman, M., Miraftabi, F., Alam, M.J., Vickers, R.J., Garey, K.W., 2016. Impact on toxin production and cell morphology in *Clostridium difficile* by ridinilazole (SMT19969), a novel treatment for *C. difficile* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 1245–1251. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv498>
- Bassis, C.M., Theriot, C.M., Young, V.B., 2014. Alteration of the murine gastrointestinal microbiota by tigecycline leads to increased susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2767–2774. <https://doi.org/10.1128/AAC.02262-13>
- Batah, J., Denève-Larrazet, C., Jolivot, P.-A., Kuehne, S., Collignon, A., Marvaud, J.-C., Kansau, I., 2016. *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF-κB pathway in epithelial cells. *Anaerobe* 38, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.01.002>
- Batah, J., Kobeissy, H., Bui Pham, P.T., Denève-Larrazet, C., Kuehne, S., Collignon, A., Janoir-Jouveshomme, C., Marvaud, J.-C., Kansau, I., 2017. *Clostridium difficile* flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins. *Sci. Rep.* 7, 3256. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03621-z>
- Bauer, M.P., Nibbering, P.H., Poxton, I.R., Kuijper, E.J., van Dissel, J.T., 2014. Humoral immune response as predictor of recurrence in *Clostridium difficile* infection. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 1323–1328. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12769>
- Bengmark, S., 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42, 2–7. <https://doi.org/10.1136/gut.42.1.2>
- Benoun, J.M., Labuda, J.C., McSorley, S.J., 2016. Collateral Damage: Detrimental Effect of Antibiotics on the Development of Protective Immune Memory. *mBio* 7, e01520-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01520-16>

- Berkell, M., Mysara, M., Xavier, B.B., van Werkhoven, C.H., Monsieurs, P., Lammens, C., Ducher, A., Vehreschild, M.J.G.T., Goossens, H., de Gunzburg, J., Bonten, M.J.M., Malhotra-Kumar, S., 2021. Microbiota-based markers predictive of development of *Clostridioides difficile* infection. *Nat. Commun.* 12, 2241. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22302-0>
- Bertolo, L., Boncheff, A.G., Ma, Z., Chen, Y.-H., Wakeford, T., Friendship, R.M., Rosseau, J., Weese, J.S., Chu, M., Mallozzi, M., Vedantam, G., Monteiro, M.A., 2012. Clostridium difficile carbohydrates: glucan in spores, PSII common antigen in cells, immunogenicity of PSII in swine and synthesis of a dual C. difficile–ETEC conjugate vaccine. *Carbohydr. Res.* 354, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.03.032>
- Best, E.L., Freeman, J., Wilcox, M.H., 2012. Models for the study of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 3, 145–167. <https://doi.org/10.4161/gmic.19526>
- Bevins, C.L., Salzman, N.H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- Bézay, N., Ayad, A., Dubischar, K., Firbas, C., Hochreiter, R., Kiermayr, S., Kiss, I., Pinl, F., Jilma, B., Westritschnig, K., 2016. Safety, immunogenicity and dose response of VLA84, a new vaccine candidate against *Clostridium difficile*, in healthy volunteers. *Vaccine* 34, 2585–2592. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.098>
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., Welling, G.W., 2011. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe, Cruising in the Amazing World of Microbial Ecosystems* 17, 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.009>
- Boekhoud, I.M., Hornung, B.V.H., Sevilla, E., Harmanus, C., Bos-Sanders, I.M.J.G., Terveer, E.M., Bolea, R., Corver, J., Kuijper, E.J., Smits, W.K., 2020. Plasmid-mediated metronidazole resistance in *Clostridioides difficile*. *Nat. Commun.* 11, 598. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14382-1>
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borriello, S.P., Welch, A.R., Barclay, F.E., Davies, H.A., 1988. Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* 25, 191–196. <https://doi.org/10.1099/00222615-25-3-191>
- Bouillaut, L., Dubois, T., Sonenshein, A.L., Dupuy, B., 2015. Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Res. Microbiol.* 166, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.002>
- Bradshaw, W.J., Roberts, A.K., Shone, C.C., Acharya, K.R., 2018. The structure of the S-layer of *Clostridium difficile*. *J. Cell Commun. Signal.* 12, 319–331. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0429-z>
- Branka, J.E., Vallette, G., Jarry, A., Bou-Hanna, C., Lemarre, P., Van, P.N., Laboisie, C.L., 1997. Early functional effects of *Clostridium difficile* toxin A on human colonocytes.

- Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M., von Eichel-Streiber, C., 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181, 29–38. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00398-8)
- Brouwer, M.S.M., Roberts, A.P., Hussain, H., Williams, R.J., Allan, E., Mullany, P., 2013. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat. Commun.* 4, 2601. <https://doi.org/10.1038/ncomms3601>
- Brown, K.A., Khanafer, N., Daneman, N., Fisman, D.N., 2013. Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2326–2332. <https://doi.org/10.1128/AAC.02176-12>
- Bruxelle, J.-F., Mizrahi, A., Hoys, S., Collignon, A., Janoir, C., Péchiné, S., 2016. Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models. *Anaerobe* 37, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.010>
- Buddle, J.E., Fagan, R.P., 2022. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence* 0, null. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>
- Buffie, C.G., Bucci, V., Stein, R.R., McKenney, P.T., Ling, L., Gobourne, A., No, D., Liu, H., Kinnebrew, M., Viale, A., Littmann, E., van den Brink, M.R.M., Jenq, R.R., Taur, Y., Sander, C., Cross, J., Toussaint, N.C., Xavier, J.B., Pamer, E.G., 2015. Precision microbiome restoration of bile acid-mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517, 205–208. <https://doi.org/10.1038/nature13828>
- Buffie, C.G., Jarchum, I., Equinda, M., Lipuma, L., Gobourne, A., Viale, A., Ubeda, C., Xavier, J., Pamer, E.G., 2012. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect. Immun.* 80, 62–73. <https://doi.org/10.1128/IAI.05496-11>
- Burger, S., Tatge, H., Hofmann, F., Genth, H., Just, I., Gerhard, R., 2003. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 584–588. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01234-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01234-8)
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A.D., Fairweather, N.F., 2002. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect. Immun.* 70, 5770–5778. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5770-5778.2002>
- Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., Fairweather, N., 2001. Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Mol. Microbiol.* 40, 1187–1199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02461.x>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J.,

- Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Carter, G.P., Chakravorty, A., Pham Nguyen, T.A., Mileto, S., Schreiber, F., Li, L., Howarth, P., Clare, S., Cunningham, B., Sambol, S.P., Cheknis, A., Figueroa, I., Johnson, S., Gerding, D., Rood, J.I., Dougan, G., Lawley, T.D., Lyras, D., 2015. Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *mBio* 6, e00551. <https://doi.org/10.1128/mBio.00551-15>
- Carter, G.P., Lyras, D., Allen, D.L., Mackin, K.E., Howarth, P.M., O'Connor, J.R., Rood, J.I., 2007. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J. Bacteriol.* 189, 7290–7301. <https://doi.org/10.1128/JB.00731-07>
- Cartman, S.T., Kelly, M.L., Heeg, D., Heap, J.T., Minton, N.P., 2012. Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcdC* genotype and toxin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4683–4690. <https://doi.org/10.1128/AEM.00249-12>
- Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., Pothoulakis, C., 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67, 302–307. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.1.302-307.1999>
- Centers for Disease Control and Prevention, 2023. 2020 Annual Report for the Emerging Infections Program for *Clostridioides difficile* Infection | Emerging Infections Program | HAI | CDC [WWW Document]. URL (accessed 7.3.23).
- Cerquetti, M., Molinari, A., Sebastianelli, A., Diociaiuti, M., Petruzzelli, R., Capo, C., Mastrantonio, P., 2000. Characterization of surface layer proteins from different *Clostridium difficile* clinical isolates. *Microb. Pathog.* 28, 363–372. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0356>
- Cerquetti, M., Serafino, A., Sebastianelli, A., Mastrantonio, P., 2002. Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32, 211–218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00556.x>
- Chan, Q.W.T., Cornman, R.S., Birol, I., Liao, N.Y., Chan, S.K., Docking, T.R., Jackman, S.D., Taylor, G.A., Jones, S.J.M., de Graaf, D.C., Evans, J.D., Foster, L.J., 2011. Updated genome assembly and annotation of *Paenibacillus larvae*, the agent of American foulbrood disease of honey bees. *BMC Genomics* 12, 450. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-450>
- Chandra, H., Kovall, R.A., Yadav, J.S., Sun, X., 2023. Host Immune Responses to Surface S-Layer Proteins (SLPs) of *Clostridioides difficile*. *Microorganisms* 11, 380. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020380>
- Chang, C.-J., Lin, T.-L., Tsai, Y.-L., Wu, T.-R., Lai, W.-F., Lu, C.-C., Lai, H.-C., 2019. Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* 27, 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.011>

- Chaves-Olarte, E., Weidmann, M., Eichel-Streiber, C., Thelestam, M., 1997. Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. *J. Clin. Invest.* 100, 1734–1741. <https://doi.org/10.1172/JCI119698>
- Chen, B., Basak, S., Chen, P., Zhang, C., Perry, K., Tian, S., Yu, C., Dong, M., Huang, L., Bowen, M.E., Jin, R., 2022. Structure and conformational dynamics of *Clostridioides difficile* toxin A. *Life Sci. Alliance* 5, e202201383. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201383>
- Chen, J., Gong, C.L., Hitchcock, M.M., Holubar, M., Deresinski, S., Hay, J.W., 2021. Cost-effectiveness of bezlotoxumab and fidaxomicin for initial *Clostridioides difficile* infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 0. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.04.004>
- Chen, P., Lam, K.-H., Liu, Z., Mindlin, F.A., Chen, B., Gutierrez, C.B., Huang, L., Zhang, Y., Hamza, T., Feng, H., Matsui, T., Bowen, M.E., Perry, K., Jin, R., 2019. Structure of the full-length *Clostridium difficile* toxin B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 712–719. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0268-0>
- Chen, X., Katchar, K., Goldsmith, J.D., Nanthakumar, N., Cheknis, A., Gerding, D.N., Kelly, C.P., 2008. A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology* 135, 1984–1992. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>
- Chiang, J.Y., 1998. Regulation of bile acid synthesis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 3, d176-193. <https://doi.org/10.2741/a273>
- Chiang, J.Y.L., 2013. Bile acid metabolism and signaling. *Compr. Physiol.* 3, 1191–1212. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120023>
- Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B.A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I., Li, H., Alekseyenko, A.V., Blaser, M.J., 2012. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 488, 621–626. <https://doi.org/10.1038/nature11400>
- Chopra, T., 2023. A profile of the live biotherapeutic product RBX2660 and its role in preventing recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 21, 243–253. <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2171986>
- Chow, J., Mazmanian, S.K., 2010. A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host Microbe* 7, 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.03.004>
- Christensen, H.R., Frøkiaer, H., Pestka, J.J., 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 171–178. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.171>
- Claesson, M.J., Cusack, S., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J.R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., van Sinderen, D., O’Connor, M., Harnedy, N., O’Connor, K., Henry, C., O’Mahony, D., Fitzgerald, A.P., Shanahan, F., Twomey, C., Hill, C., Ross, R.P., O’Toole, P.W., 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>

- Cohen, S.H., Tang, Y.J., Silva, J., 2000. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J. Infect. Dis.* 181, 659–663. <https://doi.org/10.1086/315248>
- Coleman, J.P., Hudson, L.L., 1995. Cloning and characterization of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2514–2520. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2514-2520.1995>
- Collins, D.A., Hawkey, P.M., Riley, T.V., 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2, 21. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-2-21>
- Collins, L.E., Lynch, M., Marszalowska, I., Kristek, M., Rochfort, K., O’Connell, M., Windle, H., Kelleher, D., Loscher, C.E., 2014. Surface layer proteins isolated from *Clostridium difficile* induce clearance responses in macrophages. *Microbes Infect.* 16, 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.02.001>
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A., 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812–826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
- Colomb-Cotinat, M., Assouvie, L., Durand, J., Daniau, C., Leon, L., Maugat, S., Soing-Altrach, S., Gateau, C., Couturier, J., Arnaud, I., Astagneau, P., Berger-Carbonne, A., Barbut, F., 2019. Epidemiology of *Clostridioides difficile* infections, France, 2010 to 2017. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 24, 1800638. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.35.1800638>
- Combrink, L., Humphreys, I.R., Washburn, Q., Arnold, H.K., Stagaman, K., Kasschau, K.D., Jolles, A.E., Beechler, B.R., Sharpton, T.J., 2023. Best practice for wildlife gut microbiome research: A comprehensive review of methodology for 16S rRNA gene investigations. *Front. Microbiol.* 14, 1092216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1092216>
- Cornely, O.A., Miller, M.A., Louie, T.J., Crook, D.W., Gorbach, S.L., 2012. Treatment of First Recurrence of *Clostridium difficile* Infection: Fidaxomicin Versus Vancomycin. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 55, S154–S161. <https://doi.org/10.1093/cid/cis462>
- Corthier, G., Muller, M.C., Wilkins, T.D., Lyster, D., L’Haridon, R., 1991. Protection against experimental pseudomembranous colitis in gnotobiotic mice by use of monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxin A. *Infect. Immun.* 59, 1192–1195. <https://doi.org/10.1128/iai.59.3.1192-1195.1991>
- Coullon, H., 2018. Analyse fonctionnelle des N-déacétylases de *Clostridium difficile* (These de doctorat). Université Paris-Saclay (ComUE).
- Coullon, H., Rifflet, A., Wheeler, R., Janoir, C., Boneca, I.G., Candela, T., 2018. N-Deacetylases required for muramic- δ -lactam production are involved in *Clostridium difficile* sporulation, germination, and heat resistance. *J. Biol. Chem.* 293, 18040–18054. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004273>
- Cowardin, C.A., Kuehne, S.A., Buonomo, E.L., Marie, C.S., Minton, N.P., Petri, W.A., 2015. Inflammasome Activation Contributes to Interleukin-23 Production in Response to *Clostridium difficile*. *mBio* 6, e02386-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02386-14>

- Curry, S.R., 2010. *Clostridium difficile*. Clin. Lab. Med. 30, 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.04.001>
- Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y.K., Baban, S.T., Adamo, R., Kuehne, S.A., Scarselli, M., Minton, N.P., Serruto, D., Unnikrishnan, M., 2013. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. J. Bacteriol. 195, 545–555. <https://doi.org/10.1128/JB.01980-12>
- Dapa, T., Unnikrishnan, M., 2013. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. Gut Microbes 4, 397–402. <https://doi.org/10.4161/gmic.25862>
- Darkoh, C., DuPont, H.L., Norris, S.J., Kaplan, H.B., 2015. Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. mBio 6, e02569. <https://doi.org/10.1128/mBio.02569-14>
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature 505, 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- Davies, K.A., Longshaw, C.M., Davis, G.L., Bouza, E., Barbut, F., Barna, Z., Delmée, M., Fitzpatrick, F., Ivanova, K., Kuijper, E., Macovei, I.S., Mentula, S., Mastrantonio, P., von Müller, L., Oleastro, M., Petinaki, E., Pituch, H., Norén, T., Nováková, E., Nyč, O., Rupnik, M., Schmid, D., Wilcox, M.H., 2014. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect. Dis. 14, 1208–1219. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70991-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70991-0)
- Dawson, L.F., Stabler, R.A., Wren, B.W., 2008. Assessing the role of p-cresol tolerance in *Clostridium difficile*. J. Med. Microbiol. 57, 745–749. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47744-0>
- Dawson, L.F., Valiente, E., Faulds-Pain, A., Donahue, E.H., Wren, B.W., 2012. Characterisation of *Clostridium difficile* Biofilm Formation, a Role for Spo0A. PLOS ONE 7, e50527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050527>
- de Bruyn, G., Gordon, D.L., Steiner, T., Tambyah, P., Cosgrove, C., Martens, M., Bassily, E., Chan, E.-S., Patel, D., Chen, J., Torre-Cisneros, J., Fernando De Magalhães Francesconi, C., Gesser, R., Jeanfreau, R., Launay, O., Laot, T., Morfin-Otero, R., Oviedo-Orta, E., Park, Y.S., Piazza, F.M., Rehm, C., Rivas, E., Self, S., Gurunathan, S., 2021. Safety, immunogenicity, and efficacy of a *Clostridioides difficile* toxoid vaccine candidate: a phase 3 multicentre, observer-blind, randomised, controlled trial. Lancet Infect. Dis. 21, 252–262. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30331-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30331-5)
- de Bruyn, G., Saleh, J., Workman, D., Pollak, R., Elinoff, V., Fraser, N.J., Lefebvre, G., Martens, M., Mills, R.E., Nathan, R., Trevino, M., van Cleeff, M., Foglia, G., Ozol-Godfrey, A., Patel, D.M., Pietrobon, P.J., Gesser, R., 2016. Defining the optimal formulation and schedule of a candidate toxoid vaccine against *Clostridium difficile* infection: A randomized Phase 2 clinical trial. Vaccine 34, 2170–2178. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.028>

- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poulet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P., 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- de Gunzburg, J., Ducher, A., Modess, C., Wegner, D., Oswald, S., Dressman, J., Augustin, V., Feger, C., Andremont, A., Weitschies, W., Siegmund, W., 2015. Targeted adsorption of molecules in the colon with the novel adsorbent-based medicinal product, DAV132: A proof of concept study in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 55, 10–16. <https://doi.org/10.1002/jcph.359>
- De Roo, A.C., Regenbogen, S.E., 2020. *Clostridium difficile* Infection: An Epidemiology Update. *Clin. Colon Rectal Surg.* 33, 49–57. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1701229>
- Deakin, L.J., Clare, S., Fagan, R.P., Dawson, L.F., Pickard, D.J., West, M.R., Wren, B.W., Fairweather, N.F., Dougan, G., Lawley, T.D., 2012. The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infect. Immun.* 80, 2704–2711. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-12>
- Deng, H., Yang, S., Zhang, Y., Qian, K., Zhang, Z., Liu, Y., Wang, Y., Bai, Y., Fan, H., Zhao, X., Zhi, F., 2018. *Bacteroides fragilis* Prevents *Clostridium difficile* Infection in a Mouse Model by Restoring Gut Barrier and Microbiome Regulation. *Front. Microbiol.* 9, 2976. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02976>
- Derrien, M., Alvarez, A.-S., de Vos, W.M., 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol.* 27, 997–1010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>
- Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., de Vos, W.M., 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1469–1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>
- Dethlefsen, L., Relman, D.A., 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- DiGiulio, D.B., Romero, R., Amogan, H.P., Kusanovic, J.P., Bik, E.M., Gotsch, F., Kim, C.J., Erez, O., Edwin, S., Relman, D.A., 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One* 3, e3056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003056>
- Dineen, S.S., McBride, S.M., Sonenshein, A.L., 2010. Integration of metabolism and virulence by *Clostridium difficile* CodY. *J. Bacteriol.* 192, 5350–5362. <https://doi.org/10.1128/JB.00341-10>
- Dineen, S.S., Villapakkam, A.C., Nordman, J.T., Sonenshein, A.L., 2007. Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol. Microbiol.* 66, 206–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05906.x>
- Dingle, K.E., Griffiths, D., Didelot, X., Evans, J., Vaughan, A., Kachrimanidou, M., Stoesser, N., Jolley, K.A., Golubchik, T., Harding, R.M., Peto, T.E., Fawley, W., Walker, A.S., Wilcox, M., Crook, D.W., 2011. Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity. *PLoS One* 6, e19993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019993>

- Dingle, T.C., Mulvey, G.L., Armstrong, G.D., 2011. Mutagenic Analysis of the *Clostridium difficile* Flagellar Proteins, FliC and FliD, and Their Contribution to Virulence in Hamsters. *Infect. Immun.* 79, 4061–4067. <https://doi.org/10.1128/iai.05305-11>
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Donald, R.G.K., Flint, M., Kalyan, N., Johnson, E., Witko, S.E., Kotash, C., Zhao, P., Megati, S., Yurgelonis, I., Lee, P.K., Matsuka, Y.V., Severina, E., Deatly, A., Sidhu, M., Jansen, K.U., Minton, N.P., Anderson, A.S., 2013. A novel approach to generate a recombinant toxoid vaccine against *Clostridium difficile*. *Microbiology* 159, 1254–1266. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066712-0>
- Donelli, G., Vuotto, C., Cardines, R., Mastrantonio, P., 2012. Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 318–325. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00962.x>
- Drudy, D., Calabi, E., Kyne, L., Sougioultzis, S., Kelly, E., Fairweather, N., Kelly, C.P., 2004. Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.03.007>
- Drudy, D., Fanning, S., Kyne, L., 2007. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 11, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.04.003>
- Drudy, D., O'Donoghue, D.P., Baird, A., Fenelon, L., O'Farrelly, C., 2001. Flow cytometric analysis of *Clostridium difficile* adherence to human intestinal epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* 50, 526–534. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-6-526>
- Dsouza, M., Menon, R., Crossette, E., Bhattarai, S.K., Schneider, J., Kim, Y.-G., Reddy, S., Caballero, S., Felix, C., Cornacchione, L., Hendrickson, J., Watson, A.R., Minot, S.S., Greenfield, N., Schopf, L., Szabady, R., Patarroyo, J., Smith, W., Harrison, P., Kuijper, E.J., Kelly, C.P., Olle, B., Bobilev, D., Silber, J.L., Bucci, V., Roberts, B., Faith, J., Norman, J.M., 2022. Colonization of the live biotherapeutic product VE303 and modulation of the microbiota and metabolites in healthy volunteers. *Cell Host Microbe* 30, 583–598.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.03.016>
- Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., Zhu, G., 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 53, 1–8. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100335>
- Dubinsky, V., Reshef, L., Bar, N., Keizer, D., Golan, N., Rabinowitz, K., Godny, L., Yadgar, K., Zonensain, K., Tulchinsky, H., Gophna, U., Dotan, I., 2020. Predominantly Antibiotic-resistant Intestinal Microbiome Persists in Patients With Pouchitis Who Respond to Antibiotic Therapy. *Gastroenterology* 158, 610–624.e13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.10.001>
- Dubois, T., Tremblay, Y.D.N., Hamiot, A., Martin-Verstraete, I., Deschamps, J., Monot, M., Briandet, R., Dupuy, B., 2019. A microbiota-generated bile salt induces biofilm formation in *Clostridium difficile*. *NPJ Biofilms Microbiomes* 5, 14. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0087-4>

- Dupuy, B., Sonenshein, A.L., 1998. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol. Microbiol.* 27, 107–120. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00663.x>
- Eaton, K.A., Morgan, D.R., Krakowka, S., 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 37, 123–127. <https://doi.org/10.1099/00222615-37-2-123>
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Eckert, C., Emirian, A., Le Monnier, A., Cathala, L., De Montclos, H., Goret, J., Berger, P., Petit, A., De Chevigny, A., Jean-Pierre, H., Nebbad, B., Camiade, S., Meckenstock, R., Lalande, V., Marchandin, H., Barbut, F., 2014. Prevalence and pathogenicity of binary toxin–positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect.* 3, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.10.003>
- Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edwards, A.N., Anjuwon-Foster, B.R., McBride, S.M., 2019. RstA Is a Major Regulator of *Clostridioides difficile* Toxin Production and Motility. *mBio* 10, e01991-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01991-18>
- Edwards, A.N., Karim, S.T., Pascual, R.A., Jowhar, L.M., Anderson, S.E., McBride, S.M., 2016a. Chemical and Stress Resistances of *Clostridium difficile* Spores and Vegetative Cells. *Front. Microbiol.* 7, 1698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01698>
- Edwards, A.N., Krall, E.G., McBride, S.M., 2020. Strain-Dependent RstA Regulation of *Clostridioides difficile* Toxin Production and Sporulation. *J. Bacteriol.* 202, e00586-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00586-19>
- Edwards, A.N., Tamayo, R., McBride, S.M., 2016b. A novel regulator controls *Clostridium difficile* sporulation, motility and toxin production. *Mol. Microbiol.* 100, 954–971. <https://doi.org/10.1111/mmi.13361>
- Egerer, M., Gieseemann, T., Herrmann, C., Aktories, K., 2009. Autocatalytic processing of *Clostridium difficile* toxin B. Binding of inositol hexakisphosphate. *J. Biol. Chem.* 284, 3389–3395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806002200>
- Elie, C., Perret, M., Hage, H., Sentausa, E., Hesketh, A., Louis, K., Fritah-Lafont, A., Leissner, P., Vachon, C., Rostaing, H., Reynier, F., Gervasi, G., Saliou, A., 2023. Comparison of DNA extraction methods for 16S rRNA gene sequencing in the analysis of the human gut microbiome. *Sci. Rep.* 13, 10279. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33959-6>
- Elkins, C.A., Moser, S.A., Savage, D.C., 2001. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 3403–3412. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-12-3403>
- Elliott, B., Reed, R., Chang, B.J., Riley, T.V., 2009. Bacteremia with a large clostridial toxin-negative, binary toxin-positive strain of *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 15, 249–251. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.08.006>

- Ernst, K., Langer, S., Kaiser, E., Osseforth, C., Michaelis, J., Popoff, M.R., Schwan, C., Aktories, K., Kahlert, V., Malesevic, M., Schiene-Fischer, C., Barth, H., 2015. Cyclophilin-Facilitated Membrane Translocation as Pharmacological Target to Prevent Intoxication of Mammalian Cells by Binary Clostridial Actin ADP-Ribosylated Toxins. *J. Mol. Biol., Elucidation of Protein Translocation Pathways (Part II)* 427, 1224–1238. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.013>
- Escudíé, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018a. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Escudíé, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018b. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- European Centre for Disease Prevention and Control., 2022. *Clostridioides (Clostridium) difficile* infections - Annual Epidemiological Report for 2016–2017 [WWW Document]. Eur. Cent. Dis. Prev. Control. URL (accessed 1.31.23).
- European Centre for Disease Prevention and Control., 2016. *Clostridium difficile* infections - Facts and surveillance [WWW Document]. URL (accessed 6.4.23).
- Fagan, R.P., Albesa-Jové, D., Qazi, O., Svergun, D.I., Brown, K.A., Fairweather, N.F., 2009. Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*. *Mol. Microbiol.* 71, 1308–1322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06603.x>
- Fagan, R.P., Fairweather, N.F., 2014. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 211–222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3213>
- Fagan, R.P., Janoir, C., Collignon, A., Mastrantonio, P., Poxton, I.R., Fairweather, N.F., 2011. A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 60, 1225–1228. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028472-0>
- Farooq, P.D., Urrunaga, N.H., Tang, D.M., von Rosenvinge, E.C., 2015. Pseudomembranous colitis. *Dis.-Mon. DM* 61, 181–206. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2015.01.006>
- Farrell, R.J., LaMont, J.T., 2000. Pathogenesis and clinical manifestations of *Clostridium difficile* diarrhea and colitis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 250, 109–125. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06272-2_6
- Faulds-Pain, A., Twine, S.M., Vinogradov, E., Strong, P.C.R., Dell, A., Buckley, A.M., Douce, G.R., Valiente, E., Logan, S.M., Wren, B.W., 2014. The post-translational modification of the *Clostridium difficile* flagellin affects motility, cell surface properties and virulence. *Mol. Microbiol.* 94, 272–289. <https://doi.org/10.1111/mmi.12755>
- Faulds-Pain, A., Wren, B.W., 2013. Improved Bacterial Mutagenesis by High-Frequency Allele Exchange, Demonstrated in *Clostridium difficile* and *Streptococcus suis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4768–4771. <https://doi.org/10.1128/AEM.01195-13>

- Fehlbaum, S., Chassard, C., Schwab, C., Voolaid, M., Fourmestraux, C., Derrien, M., Lacroix, C., 2019. In vitro Study of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1518 in Healthy and *Clostridioides difficile* Colonized Elderly Gut Microbiota. *Front. Nutr.* 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00184>
- Feuerstadt, P., Louie, T.J., Lashner, B., Wang, E.E.L., Diao, L., Bryant, J.A., Sims, M., Kraft, C.S., Cohen, S.H., Berenson, C.S., Korman, L.Y., Ford, C.B., Litcofsky, K.D., Lombardo, M.-J., Wortman, J.R., Wu, H., Auniš, J.G., McChalicher, C.W.J., Winkler, J.A., McGovern, B.H., Trucksis, M., Henn, M.R., von Moltke, L., 2022. SER-109, an Oral Microbiome Therapy for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *N. Engl. J. Med.* 386, 220–229. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2106516>
- Fimlaid, K.A., Bond, J.P., Schutz, K.C., Putnam, E.E., Leung, J.M., Lawley, T.D., Shen, A., 2013. Global Analysis of the Sporulation Pathway of *Clostridium difficile*. *PLOS Genet.* 9, e1003660. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003660>
- Fortier, L.-C., 2018. Bacteriophages Contribute to Shaping *Clostridioides (Clostridium) difficile* Species. *Front. Microbiol.* 9, 2033. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02033>
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
- Franz, C.M., Specht, I., Haberer, P., Holzappel, W.H., 2001. Bile salt hydrolase activity of Enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *J. Food Prot.* 64, 725–729. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.5.725>
- Frey, S.M., Wilkins, T.D., 1992. Localization of two epitopes recognized by monoclonal antibody PCG-4 on *Clostridium difficile* toxin A. *Infect. Immun.* 60, 2488–2492. <https://doi.org/10.1128/iai.60.6.2488-2492.1992>
- Frost, L.R., Cheng, J.K.J., Unnikrishnan, M., 2021. *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut? *PLoS Pathog.* 17, e1009348. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009348>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N.N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J.M., Topping, D.L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., Ohno, H., 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Furuya-Kanamori, L., Doi, S.A.R., Paterson, D.L., Helms, S.K., Yakob, L., McKenzie, S.J., Garborg, K., Emanuelsson, F., Stollman, N., Kronman, M.P., Clark, J., Huber, C.A., Riley, T.V., Clements, A.C.A., 2017. Upper Versus Lower Gastrointestinal Delivery for Transplantation of Fecal Microbiota in Recurrent or Refractory *Clostridium difficile* Infection: A Collaborative Analysis of Individual Patient Data From 14 Studies. *J. Clin. Gastroenterol.* 51, 145. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000511>
- Furuya-Kanamori, L., Marquess, J., Yakob, L., Riley, T.V., Paterson, D.L., Foster, N.F., Huber, C.A., Clements, A.C.A., 2015. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology

and clinical implications. BMC Infect. Dis. 15, 516. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1258-4>

- Galdys, A.L., Nelson, J.S., Shutt, K.A., Schlackman, J.L., Pakstis, D.L., Pasculle, A.W., Marsh, J.W., Harrison, L.H., Curry, S.R., 2014. Prevalence and duration of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage among healthy subjects in Pittsburgh, Pennsylvania. J. Clin. Microbiol. 52, 2406–2409. <https://doi.org/10.1128/JCM.00222-14>
- García-Cañaveras, J.C., Donato, M.T., Castell, J.V., Lahoz, A., 2012. Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method. J. Lipid Res. 53, 2231–2241. <https://doi.org/10.1194/jlr.D028803>
- Garey, K.W., Sethi, S., Yadav, Y., DuPont, H.L., 2008. Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. J. Hosp. Infect. 70, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.08.012>
- Gateau, C., Couturier, J., Coia, J., Barbut, F., 2018. How to: diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24, 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.005>
- George, R.H., Symonds, J.M., Dimock, F., Brown, J.D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M.R., Alexander-Williams, J., Burdon, D.W., 1978. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. Br Med J 1, 695–695. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6114.695>
- Gerding, D.N., Johnson, S., Rupnik, M., Aktories, K., 2014. *Clostridium difficile* binary toxin CDT. Gut Microbes 5, 15–27. <https://doi.org/10.4161/gmic.26854>
- Gerding, D.N., Meyer, T., Lee, C., Cohen, S.H., Murthy, U.K., Poirier, A., Van Schooneveld, T.C., Pardi, D.S., Ramos, A., Barron, M.A., Chen, H., Villano, S., 2015. Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection: a randomized clinical trial. JAMA 313, 1719–1727. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3725>
- Gergely Szabo, B., Kadar, B., Szidonia Lenart, K., Dezsényi, B., Kunovszki, P., Fried, K., Kamotsay, K., Nikolova, R., Prinz, G., 2016. Use of intravenous tigecycline in patients with severe *Clostridium difficile* infection: a retrospective observational cohort study. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 22, 990–995. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.08.017>
- Gerhard, R., Nottrott, S., Schoentaube, J., Tatge, H., Olling, A., Just, I., 2008. Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. J. Med. Microbiol. 57, 765–770. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47769-0>
- Geric, B., Johnson, S., Gerding, D.N., Grabnar, M., Rupnik, M., 2003. Frequency of binary toxin genes among *Clostridium difficile* strains that do not produce large clostridial toxins. J. Clin. Microbiol. 41, 5227–5232. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5227-5232.2003>
- Ghimire, S., Roy, C., Wongkuna, S., Antony, L., Maji, A., Keena, M.C., Foley, A., Scaria, J., 2020. Identification of *Clostridioides difficile*-Inhibiting Gut Commensals Using Culturomics, Phenotyping, and Combinatorial Community Assembly. mSystems 5, e00620-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00620-19>

- Gilbert, J., Leslie, J., Putler, R., Weiner, S., Standke, A., Penkevich, A., Keidan, M., Young, V.B., Rao, K., 2021. Anti-toxin antibody is not associated with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 67, 102299. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102299>
- Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E., 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312, 1355–1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Goldenberg, J.Z., Yap, C., Lytvyn, L., Lo, C.K.-F., Beardsley, J., Mertz, D., Johnston, B.C., 2017. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006095.pub4>
- Goldstein, E.J.C., Citron, D.M., Gerding, D.N., Wilcox, M.H., Gabryelski, L., Pedley, A., Zeng, Z., Dorr, M.B., 2020. Bezlotoxumab for the Prevention of Recurrent *Clostridioides difficile* Infection: 12-Month Observational Data From the Randomized Phase III Trial, MODIFY II. *Clin. Infect. Dis.* 71, 1102–1105. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1151>
- Goodrich, J.K., Di Rienzi, S.C., Poole, A.C., Koren, O., Walters, W.A., Caporaso, J.G., Knight, R., Ley, R.E., 2014. Conducting a microbiome study. *Cell* 158, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Govind, R., Dupuy, B., 2012. Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLOS Pathog.* 8, e1002727. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002727>
- Govind, R., Vedyappan, G., Rolfe, R.D., Fralick, J.A., 2006. Evidence that *Clostridium difficile* TcdC Is a Membrane-Associated Protein. *J. Bacteriol.* 188, 3716–3720. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3716-3720.2006>
- Grice, E.A., Segre, J.A., 2012. The human microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 13, 151–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814>
- Grider, J.R., 1994. Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *J. Nutr.* 124, 1334S-1339S. https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_8.1334S
- Griffin, A., Baraho-Hassan, D., McSorley, S.J., 2009. Successful treatment of bacterial infection hinders development of acquired immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 1263–1270. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900772>
- Grill, J., Schneider, F., Crociani, J., Ballongue, J., 1995. Purification and Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2577–2582. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2577-2582.1995>
- Groot, P. de, Scheithauer, T., Bakker, G.J., Prodan, A., Levin, E., Khan, M.T., Herrema, H., Ackermans, M., Serlie, M.J.M., Brauw, M. de, Levels, J.H.M., Sales, A., Gerdes, V.E., Ståhlman, M., Schimmel, A.W.M., Dallinga-Thie, G., Bergman, J.J., Holleman, F., Hoekstra, J.B.L., Groen, A., Bäckhed, F., Nieuwdorp, M., 2020. Donor metabolic characteristics drive effects of faecal microbiota transplantation on recipient insulin sensitivity, energy expenditure and intestinal transit time. *Gut* 69, 502–512. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318320>

- Grüner, N., Mattner, J., 2021. Bile Acids and Microbiota: Multifaceted and Versatile Regulators of the Liver–Gut Axis. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1397. <https://doi.org/10.3390/ijms22031397>
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., Terán, L.M., 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 135, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004>
- Guerrero, D.M., Becker, J.C., Eckstein, E.C., Kundrapu, S., Deshpande, A., Sethi, A.K., Donskey, C.J., 2013. Asymptomatic carriage of toxigenic *Clostridium difficile* by hospitalized patients. *J. Hosp. Infect.* 85, 155–158. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.07.002>
- Guery, B., Berger, P., Gauzit, R., Gourdon, M., Barbut, F., DAFNE study group, Dafne Study Group, null, Bémer, P., Bessède, E., Camou, F., Cattoir, V., Couzigou, C., Descamps, D., Dinh, A., Laurans, C., Lavigne, J.-P., Lechiche, C., Leflon-Guibout, V., Le Monnier, A., Levast, M., Mootien, J.Y., N'Guyen, Y., Piroth, L., Prazuck, T., Rogeaux, O., Roux, A.-L., Vachée, A., Vernet Garnier, V., Wallet, F., 2021. A prospective, observational study of fidaxomicin use for *Clostridioides difficile* infection in France. *J. Int. Med. Res.* 49, 3000605211021278. <https://doi.org/10.1177/03000605211021278>
- Gülke, I., Pfeifer, G., Liese, J., Fritz, M., Hofmann, F., Aktories, K., Barth, H., 2001. Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 69, 6004–6011. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6004-6011.2001>
- Gulliver, E.L., Young, R.B., Chonwerawong, M., D'Adamo, G.L., Thomason, T., Widdop, J.T., Rutten, E.L., Rossetto Marcelino, V., Bryant, R.V., Costello, S.P., O'Brien, C.L., Hold, G.L., Giles, E.M., Forster, S.C., 2022. Review article: the future of microbiome-based therapeutics. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 56, 192–208. <https://doi.org/10.1111/apt.17049>
- Hall, C.W., Mah, T.-F., 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Hall, I.C., O'Toole, E., 1935. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am. J. Dis. Child.* 49, 390–402. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1935.01970020105010>
- Hammond, G.A., Johnson, J.L., 1995. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb. Pathog.* 19, 203–213. [https://doi.org/10.1016/s0882-4010\(95\)90263-5](https://doi.org/10.1016/s0882-4010(95)90263-5)
- Hansen, A., Alston, L., Tulk, S.E., Schenck, L.P., Grassie, M.E., Alhassan, B.F., Veermalla, A.T., Al-Bashir, S., Gendron, F.-P., Altier, C., MacDonald, J.A., Beck, P.L., Hirota, S.A., 2013. The P2Y6 receptor mediates *Clostridium difficile* toxin-induced CXCL8/IL-8 production and intestinal epithelial barrier dysfunction. *PLoS One* 8, e81491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081491>
- Hasegawa, M., Kamada, N., Jiao, Y., Liu, M.Z., Núñez, G., Inohara, N., 2012. Protective role of commensals against *Clostridium difficile* infection via an IL-1 β -mediated positive-feedback loop. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 3085–3091. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200821>

- Hasegawa, M., Yamazaki, T., Kamada, N., Tawaratsumida, K., Kim, Y.-G., Núñez, G., Inohara, N., 2011. Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 4872–4880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003761>
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>
- He, D., Sougioultzis, S., Hagen, S., Liu, J., Keates, S., Keates, A.C., Pothoulakis, C., Lamont, J.T., 2002. *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology* 122, 1048–1057. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32386>
- Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P., Minton, N.P., 2007. The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* 70, 452–464. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.05.021>
- Heimann, S.M., Cruz Aguilar, M.R., Mellinshof, S., Vehreschild, M.J.G.T., 2018. Economic burden and cost-effective management of *Clostridium difficile* infections. *Med. Mal. Infect.* 48, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.10.010>
- Hemmasi, S., Czulkies, B.A., Schorch, B., Veit, A., Aktories, K., Papatheodorou, P., 2015. Interaction of the *Clostridium difficile* Binary Toxin CDT and Its Host Cell Receptor, Lipolysis-stimulated Lipoprotein Receptor (LSR). *J. Biol. Chem.* 290, 14031–14044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.650523>
- Heuler, J., Fortier, L.-C., Sun, X., 2021. *Clostridioides difficile* phage biology and application. *FEMS Microbiol. Rev.* 45, fuab012. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab012>
- Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., Margolles, A., 2015. Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Front. Microbiol.* 6, 1285. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01285>
- Higgins, D., Dworkin, J., 2012. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hillman, E.T., Lu, H., Yao, T., Nakatsu, C.H., 2017. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ.* 32, 300–313. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17017>
- Ho, J.G.S., Greco, A., Rupnik, M., Ng, K.K.-S., 2005. Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18373–18378. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506391102>

- Hofmann, A.F., 2009. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 2584–2598. <https://doi.org/10.2741/3399>
- Hong, H.A., Hitri, K., Hosseini, S., Kotowicz, N., Bryan, D., Mawas, F., Wilkinson, A.J., van Broekhoven, A., Kearsley, J., Cutting, S.M., 2017. Mucosal Antibodies to the C Terminus of Toxin A Prevent Colonization of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 85, e01060-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.01060-16>
- Hota, S.S., Sales, V., Tomlinson, G., Salpeter, M.J., McGeer, A., Coburn, B., Guttman, D.S., Low, D.E., Poutanen, S.M., 2017. Oral Vancomycin Followed by Fecal Transplantation Versus Tapering Oral Vancomycin Treatment for Recurrent *Clostridium difficile* Infection: An Open-Label, Randomized Controlled Trial. *Clin. Infect. Dis.* 64, 265–271. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw731>
- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J.B., Wei, L., Li, J., Chen, Z.-S., 2022. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Hugon, P., Dufour, J.-C., Colson, P., Fournier, P.-E., Sallah, K., Raoult, D., 2015. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect. Dis.* 15, 1211–1219. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00293-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00293-5)
- Hundsberger, T., Braun, V., Weidmann, M., Leukel, P., Sauerborn, M., von Eichel-Streiber, C., 1997. Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur. J. Biochem.* 244, 735–742. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00735.x>
- Icho, S., Ward, J.S., Tam, J., Kocielek, L.K., Theriot, C.M., Melnyk, R.A., 2023. Intestinal bile acids provide a surmountable barrier against *C. difficile* TcdB-induced disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120, e2301252120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2301252120>
- Isaac, S., Scher, J.U., Djukovic, A., Jiménez, N., Littman, D.R., Abramson, S.B., Pamer, E.G., Ubeda, C., 2017. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 128–136. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw383>
- Ivanov, I.I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., Littman, D.R., 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.009>
- Jain, N., Umar, T.P., Fahner, A.-F., Gibietis, V., 2023. Advancing therapeutics for recurrent *clostridioides difficile* infections: an overview of vovst's FDA approval and implications. *Gut Microbes* 15, 2232137. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2232137>
- Jakobsson, H.E., Abrahamsson, T.R., Jenmalm, M.C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., Andersson, A.F., 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed

- Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 63, 559–566. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303249>
- Janezic, S., Mlakar, S., Rupnik, M., 2018. Dissemination of *Clostridium difficile* spores between environment and households: Dog paws and shoes. *Zoonoses Public Health* 65, 669–674. <https://doi.org/10.1111/zph.12475>
- Jangi, S., Lamont, J.T., 2010. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 51, 2–7. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d29767>
- Jank, T., Aktories, K., 2008. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol.* 16, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.011>
- Jank, T., Giesemann, T., Aktories, K., 2007. Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: new insights into structure and function. *Glycobiology* 17, 15R–22R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm004>
- Janoir, C., 2016. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe* 37, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009>
- Jiang, Z.D., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., Jun, G., Hanis, C.L., Shah, M., Hochman, L., Ankoma-Sey, V., DuPont, A.W., Wong, M.C., Alexander, A., Ke, S., DuPont, H.L., 2017. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection - fresh, or frozen, or lyophilised microbiota from a small pool of healthy donors delivered by colonoscopy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 45, 899–908. <https://doi.org/10.1111/apt.13969>
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M.L., Martín, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J.M., 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.* 51, 270–274. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0020-3>
- Johal, S.S., Lambert, C.P., Hammond, J., James, P.D., Borriello, S.P., Mahida, Y.R., 2004. Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* 57, 973–979. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015875>
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Johnson, S., 2009. Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J. Infect.* 58, 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.03.010>
- Johnson, S., Gerding, D.N., Janoff, E.N., 1992. Systemic and Mucosal Antibody Responses to Toxin A in Patients Infected with *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 166, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.6.1287>
- Johnson, S., Lavergne, V., Skinner, A.M., Gonzales-Luna, A.J., Garey, K.W., Kelly, C.P., Wilcox, M.H., 2021a. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused

Update Guidelines on Management of *Clostridioides difficile* Infection in Adults. Clin. Infect. Dis. 73, e1029–e1044. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab549>

- Johnson, S., Lavergne, V., Skinner, A.M., Gonzales-Luna, A.J., Garey, K.W., Kelly, C.P., Wilcox, M.H., 2021b. Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of *Clostridioides difficile* Infection in Adults. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 73, e1029–e1044. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab549>
- Johnson, S., Louie, T.J., Gerding, D.N., Cornely, O.A., Chasan-Taber, S., Fitts, D., Gelone, S.P., Broom, C., Davidson, D.M., Polymer Alternative for CDI Treatment (PACT) investigators, 2014. Vancomycin, metronidazole, or tolevamer for *Clostridium difficile* infection: results from two multinational, randomized, controlled trials. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 59, 345–354. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu313>
- Johnson, S., Sypura, W.D., Gerding, D.N., Ewing, S.L., Janoff, E.N., 1995. Selective neutralization of a bacterial enterotoxin by serum immunoglobulin A in response to mucosal disease. Infect. Immun. 63, 3166–3173. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3166-3173.1995>
- Jump, R.L.P., Kraft, D., Hurlless, K., Polinkovsky, A., Donskey, C.J., 2017. Impact of tigecycline versus other antibiotics on the fecal metabolome and on colonization resistance to *Clostridium difficile* in mice. Pathog. Immun. 2, 1–20. <https://doi.org/10.20411/pai.v2i1.159>
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., Aktories, K., 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. Nature 375, 500–503. <https://doi.org/10.1038/375500a0>
- Kaiser, E., Kroll, C., Ernst, K., Schwan, C., Popoff, M., Fischer, G., Buchner, J., Aktories, K., Barth, H., 2011. Membrane Translocation of Binary Actin-ADP-Ribosylating Toxins from *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* Is Facilitated by Cyclophilin A and Hsp90 α . Infect. Immun. 79, 3913–3921. <https://doi.org/10.1128/IAI.05372-11>
- Kaleko, M., Bristol, J.A., Hubert, S., Parsley, T., Widmer, G., Tzipori, S., Subramanian, P., Hasan, N., Koski, P., Kokai-Kun, J., Sliman, J., Jones, A., Connelly, S., 2016. Development of SYN-004, an oral beta-lactamase treatment to protect the gut microbiome from antibiotic-mediated damage and prevent *Clostridium difficile* infection. Anaerobe, ClostPath 2015 41, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.015>
- Kao, D., Roach, B., Silva, M., Beck, P., Rioux, K., Kaplan, G.G., Chang, H.-J., Coward, S., Goodman, K.J., Xu, H., Madsen, K., Mason, A., Wong, G.K.-S., Jovel, J., Patterson, J., Louie, T., 2017. Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. JAMA 318, 1985–1993. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.17077>
- Karasawa, T., Ikoma, S., Yamakawa, K., Nakamura, S., 1995. A defined growth medium for *Clostridium difficile*. Microbiol. Read. Engl. 141 (Pt 2), 371–375. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-2-371>

- Karasawa, T., Maegawa, T., Nojiri, T., Yamakawa, K., Nakamura, S., 1997. Effect of arginine on toxin production by *Clostridium difficile* in defined medium. *Microbiol. Immunol.* 41, 581–585. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01895.x>
- Karjalainen, T., Saumier, N., Barc, M.-C., Delmée, M., Collignon, A., 2002. *Clostridium difficile* genotyping based on slpA variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2452–2458. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2452-2458.2002>
- Karjalainen, T., Waligora-Dupriet, A.J., Cerquetti, M., Spigaglia, P., Maggioni, A., Mauri, P., Mastrantonio, P., 2001. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 69, 3442–3446. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3442-3446.2001>
- Karlsson, S., Burman, L.G., Åkerlund, T., 1999. Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiol. Read. Engl.* 145 (Pt 7), 1683–1693. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-7-1683>
- Karlsson, S., Dupuy, B., Mukherjee, K., Norin, E., Burman, L.G., Akerlund, T., 2003. Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infect. Immun.* 71, 1784–1793. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1784-1793.2003>
- Karlsson, S., Lindberg, A., Norin, E., Burman, L.G., Akerlund, T., 2000. Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 68, 5881–5888. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.5881-5888.2000>
- Katchar, K., Taylor, C.P., Tummala, S., Chen, X., Sheikh, J., Kelly, C.P., 2007. Association between IgG2 and IgG3 subclass responses to toxin A and recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 5, 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.02.025>
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Iwai, N., Nakamura, H., Yamamoto, T., Suzuki, K., Kim, S.M., Chong, Y., Wasito, E.B., 1998. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2178–2182. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.8.2178-2182.1998>
- Kato, H., Yokoyama, T., Arakawa, Y., 2005. Typing by sequencing the slpA gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. *J. Med. Microbiol.* 54, 167–171. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45807-0>
- Kaus, G.M., Snyder, L.F., Müh, U., Flores, M.J., Popham, D.L., Ellermeier, C.D., 2020. Lysozyme Resistance in *Clostridioides difficile* Is Dependent on Two Peptidoglycan Deacetylases. *J. Bacteriol.* 202, e00421-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00421-20>
- Kawamoto, K., Horibe, I., Uchida, K., 1989. Purification and characterization of a new hydrolase for conjugated bile acids, chenodeoxycholytaurine hydrolase, from *Bacteroides vulgatus*. *J. Biochem. (Tokyo)* 106, 1049–1053. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122962>

- Kelly, C.P., 2012. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18 Suppl 6, 21–27. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12046>
- Kelly, C.R., Fischer, M., Allegretti, J.R., LaPlante, K., Stewart, D.B., Limketkai, B.N., Stollman, N.H., 2021. ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. Am. J. Gastroenterol. 116, 1124–1147. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001278>
- Kevorkian, Y., Shen, A., 2017. Revisiting the Role of Csp Family Proteins in Regulating *Clostridium difficile* Spore Germination. J. Bacteriol. 199, e00266-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00266-17>
- Kevorkian, Y., Shirley, D.J., Shen, A., 2016. Regulation of *Clostridium difficile* spore germination by the CspA pseudoprotease domain. Biochimie 122, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.023>
- Khanna, S., Montassier, E., Schmidt, B., Patel, R., Knights, D., Pardi, D.S., Kashyap, P., 2016. Gut microbiome predictors of treatment response and recurrence in primary *Clostridium difficile* infection. Aliment. Pharmacol. Ther. 44, 715–727. <https://doi.org/10.1111/apt.13750>
- Kieser, S., Zdobnov, E.M., Trajkovski, M., 2022. Comprehensive mouse microbiota genome catalog reveals major difference to its human counterpart. PLoS Comput. Biol. 18, e1009947. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009947>
- Kim, G.-B., Yi, S.-H., Lee, B.H., 2004. Purification and characterization of three different types of bile salt hydrolases from *Bifidobacterium* strains. J. Dairy Sci. 87, 258–266. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73164-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73164-1)
- Kirk, J.A., Gebhart, D., Buckley, A.M., Lok, S., Scholl, D., Douce, G.R., Govoni, G.R., Fagan, R.P., 2017a. New class of precision antimicrobials redefines role of *Clostridium difficile* S-layer in virulence and viability. Sci. Transl. Med. 9, eaah6813. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6813>
- Kirk, J.A., Gebhart, D., Buckley, A.M., Lok, S., Scholl, D., Douce, G.R., Govoni, G.R., Fagan, R.P., 2017b. New Class of Precision Antimicrobials Redefines Role of *Clostridium difficile* S-layer in Virulence and Viability. Sci. Transl. Med. 9, eaah6813. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah6813>
- Klaus, N., D, K., A, R., 2016. Asymptomatic and yet *C. difficile*-toxin positive? Prevalence and risk factors of carriers of toxigenic *Clostridium difficile* among geriatric in-patients. BMC Geriatr. 16. <https://doi.org/10.1186/s12877-016-0358-3>
- Knetsch, C.W., Connor, T.R., Mutreja, A., Dorp, S.M. van, Sanders, I.M., Browne, H.P., Harris, D., Lipman, L., Keessen, E.C., Corver, J., Kuijper, E.J., Lawley, T.D., 2014. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. Eurosurveillance 19, 20954. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.45.20954>
- Knight, D.R., Giglio, S., Huntington, P.G., Korman, T.M., Kotsanas, D., Moore, C.V., Paterson, D.L., Prendergast, L., Huber, C.A., Robson, J., Waring, L., Wehrhahn, M.C., Weldhagen, G.F.,

- Wilson, R.M., Riley, T.V., 2015. Surveillance for antimicrobial resistance in Australian isolates of *Clostridium difficile*, 2013–14. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2992–2999. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv220>
- Knight, D.R., Riley, T.V., 2019. Genomic Delineation of Zoonotic Origins of *Clostridium difficile*. *Front. Public Health* 7, 164. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00164>
- Knight, D.R., Squire, M.M., Collins, D.A., Riley, T.V., 2016. Genome Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian Pigs and Humans Reveals a Diverse Genetic Repertoire and Signatures of Long-Range Interspecies Transmission. *Front. Microbiol.* 7, 2138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02138>
- Kochan, T.J., Somers, M.J., Kaiser, A.M., Shoshiev, M.S., Hagan, A.K., Hastie, J.L., Giordano, N.P., Smith, A.D., Schubert, A.M., Carlson, P.E., Hanna, P.C., 2017. Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of *Clostridium difficile* spores. *PLoS Pathog.* 13, e1006443. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006443>
- Koenigsnecht, M.J., Theriot, C.M., Bergin, I.L., Schumacher, C.A., Schloss, P.D., Young, V.B., 2015. Dynamics and establishment of *Clostridium difficile* infection in the murine gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 83, 934–941. <https://doi.org/10.1128/IAI.02768-14>
- Kokai-Kun, J.F., Roberts, T., Coughlin, O., Le, C., Whalen, H., Stevenson, R., Wachter, V.J., Sliman, J., 2019. Use of ribaxamase (SYN-004), a β -lactamase, to prevent *Clostridium difficile* infection in β -lactam-treated patients: a double-blind, phase 2b, randomised placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 19, 487–496. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30731-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30731-X)
- Kordus, S.L., Thomas, A.K., Lacy, D.B., 2022. Clostridioides difficile toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. *Nat. Rev. Microbiol.* 20, 285–298. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00660-2>
- Krivan, H.C., Clark, G.F., Smith, D.F., Wilkins, T.D., 1986. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. *Infect. Immun.* 53, 573–581. <https://doi.org/10.1128/iai.53.3.573-581.1986>
- Krutova, M., Wilcox, M., Kuijper, J.E., 2022. *Clostridioides difficile* infection: are the three currently used antibiotic treatment options equal from pharmacological and microbiological points of view? *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* S1201-9712(22)00512–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.09.013>
- Kuehne, S.A., Collery, M.M., Kelly, M.L., Cartman, S.T., Cockayne, A., Minton, N.P., 2014. Importance of Toxin A, Toxin B, and CDT in Virulence of an Epidemic *Clostridium difficile* Strain. *J. Infect. Dis.* 209, 83–86. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit426>
- Kuhajda, K., Kandrak, J., Kevresan, S., Mikov, M., Fawcett, J.P., 2006. Structure and origin of bile acids: an overview. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 31, 135–143. <https://doi.org/10.1007/BF03190710>

- Kuijper, E.J., Coignard, B., Tüll, P., 2006. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x>
- Kullin, B., Abratt, V.R., Reid, S.J., Riley, T.V., 2022. *Clostridioides difficile* infection in Africa: A narrative review. *Anaerobe* 74, 102549. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102549>
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., Kelly, C.P., 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet Lond. Engl.* 357, 189–193. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03592-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03592-3)
- Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., Kelly, C.P., 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N. Engl. J. Med.* 342, 390–397. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002103420604>
- LaFrance, M.E., Farrow, M.A., Chandrasekaran, R., Sheng, J., Rubin, D.H., Lacy, D.B., 2015. Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 7073–7078. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500791112>
- Lance George, W., Goldstein, Ellie C., Sutter, Vera L., Ludwig, Shelly L., Finegold, Sydney M., 1978. Aetiology of antimicrobial agent associated colitis. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8068 311, 802–803. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)93001-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)93001-5)
- Larson, H.E., Price, A.B., Honour, P., Borriello, S.P., 1978. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8073 311, 1063–1066. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)90912-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)90912-1)
- Lawley, T.D., Croucher, N.J., Yu, L., Clare, S., Sebahia, M., Goulding, D., Pickard, D.J., Parkhill, J., Choudhary, J., Dougan, G., 2009. Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *J. Bacteriol.* 191, 5377–5386. <https://doi.org/10.1128/JB.00597-09>
- Lawson, P.A., Citron, D.M., Tyrrell, K.L., Finegold, S.M., 2016. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Lawson, P.A., Rainey, F.A., 2016. Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1009–1016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000824>
- Le Monnier, A., Candela, T., Mizrahi, A., Bille, E., Bourgeois-Nicolaos, N., Cattoir, V., Farfour, E., Grall, I., Lecoïnte, D., Limelette, A., Marcade, G., Poilane, I., Poupy, P., Kansau, I., Zahar, J.-R., Pilmis, B., GMC Group, 2022. One-day prevalence of asymptomatic carriage of toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* in 10 French hospitals. *J. Hosp. Infect.* 129, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.05.011>
- Le Monnier, A., Duburcq, A., Zahar, J.-R., Corvec, S., Guillard, T., Cattoir, V., Woerther, P.-L., Fihman, V., Lalande, V., Jacquier, H., Mizrahi, A., Farfour, E., Morand, P., Marcadé, G.,

- Coulomb, S., Torreton, E., Fagnani, F., Barbut, F., 2015. Hospital cost of *Clostridium difficile* infection including the contribution of recurrences in French acute-care hospitals. *J. Hosp. Infect.* 91, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.06.017>
- Lecerf, J.M., Delzenne, N., 2021. *Microbiote intestinale et santé humaine*. Elsevier Health Sciences.
- Lee, C.H., Steiner, T., Petrof, E.O., Smieja, M., Roscoe, D., Nematallah, A., Weese, J.S., Collins, S., Moayyedi, P., Crowther, M., Ropeleski, M.J., Jayaratne, P., Higgins, D., Li, Y., Rau, N.V., Kim, P.T., 2016. Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 315, 142–149. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.18098>
- Lee, J.Y., Kim, H., Cha, M.Y., Park, H.G., Kim, Y.-J., Kim, I.Y., Kim, J.M., 2009. *Clostridium difficile* toxin A promotes dendritic cell maturation and chemokine CXCL2 expression through p38, IKK, and the NF-kappaB signaling pathway. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 87, 169–180. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0415-2>
- Leeds, J.A., Sachdeva, M., Mullin, S., Barnes, S.W., Ruzin, A., 2014. In vitro selection, via serial passage, of *Clostridium difficile* mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 41–44. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt302>
- Leslie, J.L., Vendrov, K.C., Jenior, M.L., Young, V.B., 2019. The Gut Microbiota Is Associated with Clearance of *Clostridium difficile* Infection Independent of Adaptive Immunity. *mSphere* 4. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00698-18>
- Lesniak, N.A., Schubert, A.M., Sinani, H., Schloss, P.D., 2021. Clearance of *Clostridioides difficile* Colonization Is Associated with Antibiotic-Specific Bacterial Changes. *mSphere* 6, e01238-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01238-20>
- Lessa, F.C., Mu, Y., Bamberg, W.M., Beldavs, Z.G., Dumyati, G.K., Dunn, J.R., Farley, M.M., Holzbauer, S.M., Meek, J.I., Phipps, E.C., Wilson, L.E., Winston, L.G., Cohen, J.A., Limbago, B.M., Fridkin, S.K., Gerding, D.N., McDonald, L.C., 2015. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N. Engl. J. Med.* 372, 825–834. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408913>
- Leuzzi, R., Spencer, J., Buckley, A., Brettoni, C., Martinelli, M., Tulli, L., Marchi, S., Luzzi, E., Irvine, J., Candlish, D., Veggi, D., Pansegrau, W., Fiaschi, L., Savino, S., Swennen, E., Cakici, O., Oviedo-Orta, E., Giraldi, M., Baudner, B., D'Urzo, N., Maione, D., Soriani, M., Rappuoli, R., Pizza, M., Douce, G.R., Scarselli, M., 2013. Protective Efficacy Induced by Recombinant *Clostridium difficile* Toxin Fragments. *Infect. Immun.* 81, 2851–2860. <https://doi.org/10.1128/IAI.01341-12>
- Levett, P.N., 1985. Effect of basal medium upon fluorescence of *Clostridium difficile*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1, 75–76. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01493.x>
- Ley, R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>

- Li, J., Dawson, P.A., 2019. Animal Models to Study Bile Acid Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1865, 895–911. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.011>
- Li, J., McClane, B.A., 2006. Further Comparison of Temperature Effects on Growth and Survival of *Clostridium perfringens* Type A Isolates Carrying a Chromosomal or Plasmid-Borne Enterotoxin Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4561–4568. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-06>
- Li, K., Buchinger, T.J., Bussy, U., Fissette, S.D., Johnson, N.S., Li, W., 2015. Quantification of 15 bile acids in lake charr feces by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1001, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.028>
- Li, X., Zhang, S., Guo, G., Han, J., Yu, J., 2022. Gut microbiome in modulating immune checkpoint inhibitors. *EBioMedicine* 82, 104163. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104163>
- Libby, J.M., Wilkins, T.D., 1982. Production of antitoxins to two toxins of *Clostridium difficile* and immunological comparison of the toxins by cross-neutralization studies. *Infect. Immun.* 35, 374–376. <https://doi.org/10.1128/iai.35.1.374-376.1982>
- Lim, S.C., Knight, D.R., Riley, T.V., 2020. *Clostridium difficile* and One Health. *Clin. Microbiol. Infect.* 26, 857–863. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>
- Lim, S.K., Stuart, R.L., Mackin, K.E., Carter, G.P., Kotsanas, D., Francis, M.J., Easton, M., Dimovski, K., Elliott, B., Riley, T.V., Hogg, G., Paul, E., Korman, T.M., Seemann, T., Stinear, T.P., Lyras, D., Jenkin, G.A., 2014. Emergence of a ribotype 244 strain of *Clostridium difficile* associated with severe disease and related to the epidemic ribotype 027 strain. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 58, 1723–1730. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu203>
- Limaye, A.P., Turgeon, D.K., Cookson, B.T., Fritsche, T.R., 2000. Pseudomembranous Colitis Caused by a Toxin A– B+ Strain of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1696–1697.
- Lin, C.-Y., Cheng, H.-T., Kuo, C.-J., Lee, Y.-S., Sung, C.-M., Keidan, M., Rao, K., Kao, J.Y., Hsieh, S.-Y., 2022. Proton Pump Inhibitor-Induced Gut Dysbiosis Increases Mortality Rates for Patients with *Clostridioides difficile* Infection. *Microbiol. Spectr.* 10, e0048622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00486-22>
- Loo, V.G., Bourgault, A.-M., Poirier, L., Lamothe, F., Michaud, S., Turgeon, N., Toye, B., Beaudoin, A., Frost, E.H., Gilca, R., Brassard, P., Dendukuri, N., Béliveau, C., Oughton, M., Brukner, I., Dascal, A., 2011. Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. *N. Engl. J. Med.* 365, 1693–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012413>
- Lorenzo-Zúñiga, V., Bartolí, R., Planas, R., Hofmann, A.F., Viñado, B., Hagey, L.R., Hernández, J.M., Mañé, J., Alvarez, M.A., Ausina, V., Gassull, M.A., 2003. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 37, 551–557. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50116>
- Louie, T., Golan, Y., Khanna, S., Bobilev, D., Erpelding, N., Fratazzi, C., Carini, M., Menon, R., Ruisi, M., Norman, J.M., Faith, J.J., Olle, B., Li, M., Silber, J.L., Pardi, D.S., 2023. VE303, a Defined

- Bacterial Consortium, for Prevention of Recurrent *Clostridioides difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. JAMA 329, 1356–1366. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.4314>
- Louie, T.J., Cannon, K., Byrne, B., Emery, J., Ward, L., Eyben, M., Krulicki, W., 2012. Fidaxomicin Preserves the Intestinal Microbiome During and After Treatment of *Clostridium difficile* Infection (CDI) and Reduces Both Toxin Reexpression and Recurrence of CDI. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 55, S132–S142. <https://doi.org/10.1093/cid/cis338>
- Louie, T.J., Miller, M.A., Mullane, K.M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Gorbach, S., Sears, P., Shue, Y.-K., 2011. Fidaxomicin versus Vancomycin for *Clostridium difficile* Infection [WWW Document]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0910812>. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910812>
- Lowy, I., Molrine, D.C., Leav, B.A., Blair, B.M., Baxter, R., Gerding, D.N., Nichol, G., Thomas, W.D., Leney, M., Sloan, S., Hay, C.A., Ambrosino, D.M., 2010. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. N. Engl. J. Med. 362, 197–205. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907635>
- Lukovac, S., Belzer, C., Pellis, L., Keijser, B.J., de Vos, W.M., Montijn, R.C., Roeselers, G., 2014. Differential modulation by Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. mBio 5, e01438-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01438-14>
- Lyerly, D.M., Saum, K.E., MacDonald, D.K., Wilkins, T.D., 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. 47, 349–352.
- Lyras, D., O'Connor, J.R., Howarth, P.M., Sambol, S.P., Carter, G.P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., Gerding, D.N., Rood, J.I., 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature 458, 1176–1179. <https://doi.org/10.1038/nature07822>
- Mackin, K.E., Carter, G.P., Howarth, P., Rood, J.I., Lyras, D., 2013. Spo0A differentially regulates toxin production in evolutionarily diverse strains of *Clostridium difficile*. PloS One 8, e79666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079666>
- Madan, R., Petri, W.A., 2012. Immune responses to *Clostridium difficile* infection. Trends Mol. Med. 18, 658–666. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.09.005>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2015. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. PeerJ 3, e1420. <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>
- Mahida, Y.R., Galvin, A., Makh, S., Hyde, S., Sanfilippo, L., Borriello, S.P., Sewell, H.F., 1998. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human colonic lamina propria cells: early loss of macrophages followed by T-cell apoptosis. Infect. Immun. 66, 5462–5469. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.11.5462-5469.1998>
- Mahida, Y.R., Makh, S., Hyde, S., Gray, T., Borriello, S.P., 1996. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and

apoptosis after cell detachment. Gut 38, 337–347.
<https://doi.org/10.1136/gut.38.3.337>

- Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E.E., Brochado, A.R., Fernandez, K.C., Dose, H., Mori, H., Patil, K.R., Bork, P., Typas, A., 2018. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. Nature 555, 623–628.
<https://doi.org/10.1038/nature25979>
- Maldarelli, G.A., De Masi, L., von Rosenvinge, E.C., Carter, M., Sonnenberg, M.S., 2014. Identification, immunogenicity, and cross-reactivity of type IV pilin and pilin-like proteins from *Clostridium difficile*. Pathog. Dis. 71, 302–314.
<https://doi.org/10.1111/2049-632X.12137>
- Malet-Villemagne, J., Yucheng, L., Evanno, L., Denis-Quanquin, S., Hugonnet, J.-E., Arthur, M., Janoir, C., Candela, T., 2023. Polysaccharide II Surface Anchoring, the Achilles' Heel of *Clostridioides difficile*. Microbiol. Spectr. 0, e04227-22.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.04227-22>
- Mallonee, D.H., White, W.B., Hylemon, P.B., 1990. Cloning and sequencing of a bile acid-inducible operon from Eubacterium sp. strain VPI 12708. J. Bacteriol. 172, 7011–7019.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.12.7011-7019.1990>
- Mani, N., Dupuy, B., 2001. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 5844–5849.
<https://doi.org/10.1073/pnas.101126598>
- Mani, N., Lyras, D., Barroso, L., Howarth, P., Wilkins, T., Rood, J.I., Sonenshein, A.L., Dupuy, B., 2002. Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. J. Bacteriol. 184, 5971–5978.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.21.5971-5978.2002>
- Mantis, N.J., Rol, N., Corthésy, B., 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunol. 4, 603–611.
<https://doi.org/10.1038/mi.2011.41>
- Marchandin, H., Anjou, C., Poulen, G., Freeman, J., Wilcox, M., Jean-Pierre, H., Barbut, F., 2023. In vivo emergence of a still uncommon resistance to fidaxomicin in the urgent antimicrobial resistance threat *Clostridioides difficile*. J. Antimicrob. Chemother. dkad194. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad194>
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., Thomas, L.V., Zoetendal, E.G., Hart, A., 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut 65, 330–339.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Marcobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E.D., Pudlo, N., Martens, E.C., Desai, P., Lebrilla, C.B., Weimer, B.C., Mills, D.A., German, J.B., Sonnenburg, J.L., 2011. Bacteroides in the Infant Gut Consume Milk Oligosaccharides via Mucus-Utilization Pathways. Cell Host Microbe 10, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.007>
- Markham, A., 2016. Bezlotoxumab: First Global Approval. Drugs 76, 1793–1798.
<https://doi.org/10.1007/s40265-016-0673-1>

- Markovska, R., Dimitrov, G., Gergova, R., Boyanova, L., 2023. *Clostridioides difficile*, a New "Superbug." *Microorganisms* 11, 845. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040845>
- Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H.J., Garza-González, E., 2022. An Update on *Clostridioides difficile* Binary Toxin. *Toxins* 14, 305. <https://doi.org/10.3390/toxins14050305>
- Matamouros, S., England, P., Dupuy, B., 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol. Microbiol.* 64, 1274–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05739.x>
- Mathias, A., Pais, B., Favre, L., Benyacoub, J., Corthésy, B., 2014. Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes* 5, 688–695. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.983763>
- McDonald, L.C., Gerding, D.N., Johnson, S., Bakken, J.S., Carroll, K.C., Coffin, S.E., Dubberke, E.R., Garey, K.W., Gould, C.V., Kelly, C., Loo, V., Shaklee Sammons, J., Sandora, T.J., Wilcox, M.H., 2018. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 66, e1–e48. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>
- McDonald, L.C., Killgore, G.E., Thompson, A., Owens, R.C., Kazakova, S.V., Sambol, S.P., Johnson, S., Gerding, D.N., 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 353, 2433–2441. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051590>
- McDonald, L.C., Owings, M., Jernigan, D.B., 2006. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 409–415. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051064>
- McFarland, L.V., Elmer, G.W., Surawicz, C.M., 2002. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 1769–1775. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2002.05839.x>
- McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H., 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 265–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- McKee, R.W., Mangalea, M.R., Purcell, E.B., Borchardt, E.K., Tamayo, R., 2013. The second messenger cyclic Di-GMP regulates *Clostridium difficile* toxin production by controlling expression of sigD. *J. Bacteriol.* 195, 5174–5185. <https://doi.org/10.1128/JB.00501-13>
- McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Meador, E., Mayer, M.J., Gasson, M.J., Steverding, D., Carding, S.R., Narbad, A., 2010. Bacteriophage treatment significantly reduces viable *Clostridium difficile* and prevents toxin production in an in vitro model system. *Anaerobe* 16, 549–554. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.08.006>

- Meader, E., Mayer, M.J., Steverding, D., Carding, S.R., Narbad, A., 2013. Evaluation of bacteriophage therapy to control *Clostridium difficile* and toxin production in an in vitro human colon model system. *Anaerobe* 22, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.05.001>
- Meouche, I.E., Peltier, J., Monot, M., Soutourina, O., Pestel-Caron, M., Dupuy, B., Pons, J.-L., 2013. Characterization of the SigD Regulon of *C. difficile* and Its Positive Control of Toxin Production through the Regulation of tcdR. *PLOS ONE* 8, e83748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083748>
- Merino, S., Tomás, J.M., 2014. Gram-Negative Flagella Glycosylation. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 2840–2857. <https://doi.org/10.3390/ijms15022840>
- Merrigan, M.M., Sambol, S.P., Johnson, S., Gerding, D.N., 2003. Prevention of fatal *Clostridium difficile*-associated disease during continuous administration of clindamycin in hamsters. *J. Infect. Dis.* 188, 1922–1927. <https://doi.org/10.1086/379836>
- Merrigan, M.M., Venugopal, A., Roxas, J.L., Anwar, F., Mallozzi, M.J., Roxas, B.A.P., Gerding, D.N., Viswanathan, V.K., Vedantam, G., 2013. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PloS One* 8, e78404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078404>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G.A., Rodriguez, J.M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., Ventura, M., 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 81, e00036-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>
- Mileto, S.J., Hutton, M.L., Walton, S.L., Das, A., Ioannidis, L.J., Ketagoda, D., Quinn, K.M., Denton, K.M., Hansen, D.S., Lyras, D., 2022. Bezlotoxumab prevents extraintestinal organ damage induced by *Clostridioides difficile* infection. *Gut Microbes* 14, 2117504. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2117504>
- Mizrahi, A., Bruxelles, J.-F., Péchiné, S., Le Monnier, A., 2018. Prospective evaluation of the adaptive immune response to SlpA in *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 54, 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.09.008>
- Mizrahi, A., Collignon, A., Péchiné, S., 2014. Passive and active immunization strategies against *Clostridium difficile* infections: state of the art. *Anaerobe* 30, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.07.006>
- Monot, M., Eckert, C., Lemire, A., Hamiot, A., Dubois, T., Tessier, C., Dumoulaud, B., Hamel, B., Petit, A., Lalande, V., Ma, L., Bouchier, C., Barbut, F., Dupuy, B., 2015. *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Sci. Rep.* 5, 15023. <https://doi.org/10.1038/srep15023>
- Monte, M.J., Marin, J.J.G., Antelo, A., Vazquez-Tato, J., 2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* 15, 804–816. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.804>

- Mori, N., Takahashi, T., 2018. Characteristics and Immunological Roles of Surface Layer Proteins in *Clostridium difficile*. *Ann. Lab. Med.* 38, 189–195. <https://doi.org/10.3343/alm.2018.38.3.189>
- Morrison, D.J., Preston, T., 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Mulligan, M.E., Miller, S.D., McFarland, L.V., Fung, H.C., Kwok, R.Y., 1993. Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 16 Suppl 4, S239–244. https://doi.org/10.1093/clinids/16.supplement_4.s239
- Murphy, K.M., Weaver, C., Berg, L.J., Janeway, C., 2022. Janeway's immunobiology, 10th edition, international student edition. ed. W.W. Norton & Company, New York, NY London.
- Murray, B.E., 1997. Vancomycin-resistant enterococci. *Am. J. Med.* 102, 284–293. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)80270-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)80270-8)
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127–141. <https://doi.org/10.1023/a:1000669317571>
- Na, X., Kim, H., Moyer, M.P., Pothoulakis, C., LaMont, J.T., 2008. gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. *Infect. Immun.* 76, 2862–2871. <https://doi.org/10.1128/IAI.00326-08>
- Nale, J.Y., Redgwell, T.A., Millard, A., Clokie, M.R.J., 2018. Efficacy of an Optimised Bacteriophage Cocktail to Clear *Clostridium difficile* in a Batch Fermentation Model. *Antibiot. Basel Switz.* 7, 13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010013>
- Nale, J.Y., Spencer, J., Hargreaves, K.R., Buckley, A.M., Trzepiński, P., Douce, G.R., Clokie, M.R.J., 2016. Bacteriophage Combinations Significantly Reduce *Clostridium difficile* Growth In Vitro and Proliferation In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 968–981. <https://doi.org/10.1128/AAC.01774-15>
- Nawrocki, K.L., Edwards, A.N., Daou, N., Bouillaut, L., McBride, S.M., 2016. CodY-Dependent Regulation of Sporulation in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 198, 2113–2130. <https://doi.org/10.1128/JB.00220-16>
- Netea, M.G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L.A.B., Schultze, J.L., 2019. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* 25, 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
- Nguyen, T.L.A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J., 2015. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis. Model. Mech.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>
- Ní Eidhin, D.B., O'Brien, J.B., McCabe, M.S., Athié-Morales, V., Kelleher, D.P., 2008. Active immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using surface-layer protein. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 207–218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00363.x>

- Nibbering, B., Gerding, D.N., Kuijper, E.J., Zwitterink, R.D., Smits, W.K., 2021. Host Immune Responses to *Clostridioides difficile*: Toxins and Beyond. *Front. Microbiol.* 12, 804949. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.804949>
- Normington, C., Moura, I.B., Bryant, J.A., Ewin, D.J., Clark, E.V., Kettle, M.J., Harris, H.C., Spittal, W., Davis, G., Henn, M.R., Ford, C.B., Wilcox, M.H., Buckley, A.M., 2021. Biofilms harbour *Clostridioides difficile*, serving as a reservoir for recurrent infection. *NPJ Biofilms Microbiomes* 7, 16. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00184-w>
- Oatley, P., Kirk, J.A., Ma, S., Jones, S., Fagan, R.P., 2020. Spatial organization of *Clostridium difficile* S-layer biogenesis. *Sci. Rep.* 10, 14089. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71059-x>
- Oberli, M.A., Hecht, M.-L., Bindschädler, P., Adibekian, A., Adam, T., Seeberger, P.H., 2011. A Possible Oligosaccharide-Conjugate Vaccine Candidate for *Clostridium difficile* Is Antigenic and Immunogenic. *Chem. Biol.* 18, 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.03.009>
- O'Brien, J.B., McCabe, M.S., Athié-Morales, V., McDonald, G.S.A., Ní Eidhin, D.B., Kelleher, D.P., 2005. Passive immunisation of hamsters against *Clostridium difficile* infection using antibodies to surface layer proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.005>
- Oezguen, N., Power, T.D., Urvil, P., Feng, H., Pothoulakis, C., Stamler, J.S., Braun, W., Savidge, T.C., 2012. Clostridial toxins. *Gut Microbes* 3, 35–41. <https://doi.org/10.4161/gmic.19250>
- O'Hara, A.M., Shanahan, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Onwueme, K., Fadairo, Y., Idoko, L., Onuh, J., Alao, O., Agaba, P., Lawson, L., Ukomadu, C., Idoko, J., 2011. High prevalence of toxinogenic *Clostridium difficile* in Nigerian adult HIV patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 667–669. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.07.014>
- Oren, A., Garrity, G.M., 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>
- Orenstein, R., 2023. The Role of Microbiome-Based Therapeutics in *Clostridioides difficile* Infection: Durable, Long-Term Results of RBX2660. *Infect. Dis. Ther.* 12, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00714-9>
- Ormsby, M.J., Vaz, F., Kirk, J.A., Barwinska-Sendra, A., Hallam, J.C., Lanzoni-Mangutchi, P., Cole, J., Chaudhuri, R.R., Salgado, P.S., Fagan, R.P., Douce, G.R., 2023. An intact S-layer is advantageous to *Clostridioides difficile* within the host. *PLoS Pathog.* 19, e1011015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011015>
- Orrell, K.E., Melnyk, R.A., 2021. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 85, e0006421. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-21>
- Orth, P., Xiao, L., Hernandez, L.D., Reichert, P., Sheth, P.R., Beaumont, M., Yang, X., Murgolo, N., Ermakov, G., DiNunzio, E., Racine, F., Karczewski, J., Secore, S., Ingram, R.N., Mayhood,

- T., Strickland, C., Therien, A.G., 2014. Mechanism of Action and Epitopes of *Clostridium difficile* Toxin B-neutralizing Antibody Bezlotoxumab Revealed by X-ray Crystallography. *J. Biol. Chem.* 289, 18008–18021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.560748>
- Palleja, A., Mikkelsen, K.H., Forslund, S.K., Kashani, A., Allin, K.H., Nielsen, T., Hansen, T.H., Liang, S., Feng, Q., Zhang, C., Pyl, P.T., Coelho, L.P., Yang, H., Wang, Jian, Typas, A., Nielsen, M.F., Nielsen, H.B., Bork, P., Wang, Jun, Vilsbøll, T., Hansen, T., Knop, F.K., Arumugam, M., Pedersen, O., 2018. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat. Microbiol.* 3, 1255–1265. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9>
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O., 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biol.* 5, e177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Pantosti, A., Cerquetti, M., Viti, F., Ortisi, G., Mastrantonio, P., 1989. Immunoblot analysis of serum immunoglobulin G response to surface proteins of *Clostridium difficile* in patients with antibiotic-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2594–2597.
- Papatheodorou, P., Carette, J.E., Bell, G.W., Schwan, C., Guttenberg, G., Brummelkamp, T.R., Aktories, K., 2011. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16422–16427. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109772108>
- Papatheodorou, P., Zamboglou, C., Genisyuer, S., Guttenberg, G., Aktories, K., 2010. Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* 5, e10673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010673>
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M.R., 2009. The protease CspB is essential for initiation of cortex hydrolysis and dipicolinic acid (DPA) release during germination of spores of *Clostridium perfringens* type A food poisoning isolates. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 3464–3472. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030965-0>
- Park, J.C., Im, S.-H., 2020. Of men in mice: the development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Exp. Mol. Med.* 52, 1383–1396. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0473-2>
- Pean De Ponfilly, G., Pilmis, B., El Kaibi, I., Castreau, N., Laplanche, S., Le Monnier, A., 2021. Is the second dose of vaccination useful in previously SARS-CoV-2-infected healthcare workers? *Infect. Dis. Now* 51, 673–675. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.07.001>
- Péchiné, S., Denève, C., Le Monnier, A., Hoys, S., Janoir, C., Collignon, A., 2011. Immunization of hamsters against *Clostridium difficile* infection using the Cwp84 protease as an antigen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63, 73–81. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00832.x>
- Péchiné, S., Gleizes, A., Janoir, C., Gorges-Kergot, R., Barc, M.-C., Delmée, M., Collignon, A., 2005a. Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 54, 193–196. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45800-0>

- Péchiné, S., Hennequin, C., Boursier, C., Hoys, S., Collignon, A., 2013. Immunization Using GroEL Decreases *Clostridium difficile* Intestinal Colonization. PLOS ONE 8, e81112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081112>
- Péchiné, S., Janoir, C., Boureau, H., Gleizes, A., Tsapis, N., Hoys, S., Fattal, E., Collignon, A., 2007. Diminished intestinal colonization by *Clostridium difficile* and immune response in mice after mucosal immunization with surface proteins of *Clostridium difficile*. Vaccine 25, 3946–3954. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.055>
- Péchiné, S., Janoir, C., Collignon, A., 2005b. Variability of *Clostridium difficile* Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with *Clostridium difficile*-Associated Disease. J. Clin. Microbiol. 43, 5018–5025. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5018-5025.2005>
- Percival, S.L., Suleman, L., Vuotto, C., Donelli, G., 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. J. Med. Microbiol. 64, 323–334. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000032>
- Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G., Popoff, M.R., 1997. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. Infect. Immun. 65, 1402–1407. <https://doi.org/10.1128/iai.65.4.1402-1407.1997>
- Permpoonpattana, P., Hong, H.A., Phetcharaburanin, J., Huang, J.-M., Cook, J., Fairweather, N.F., Cutting, S.M., 2011. Immunization with Bacillus spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. Infect. Immun. 79, 2295–2302. <https://doi.org/10.1128/IAI.00130-11>
- Petrosillo, N., Granata, G., Cataldo, M.A., 2018. Novel Antimicrobials for the Treatment of *Clostridium difficile* Infection. Front. Med. 5, 96. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00096>
- Pettit, L.J., Browne, H.P., Yu, L., Smits, W.K., Fagan, R.P., Barquist, L., Martin, M.J., Goulding, D., Duncan, S.H., Flint, H.J., Dougan, G., Choudhary, J.S., Lawley, T.D., 2014. Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism. BMC Genomics 15, 160. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-160>
- Phanchana, M., Harnvoravongchai, P., Wongkuna, S., Phetruen, T., Phothichaisri, W., Panturat, S., Pipatthana, M., Charoensutthivarakul, S., Chankhamhaengdecha, S., Janvilisri, T., 2021. Frontiers in antibiotic alternatives for *Clostridioides difficile* infection. World J. Gastroenterol. 27, 7210–7232. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i42.7210>
- Pillai, A., Nelson, R.L., 2008. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. Cochrane Database Syst. Rev. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004611.pub2>
- Pituch, H., van den Braak, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Martirosian, G., Obuch-Woszczatyński, P., Łuczak, M., Meisel-Mikołajczyk, F., 2001. Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 7, 442–446. <https://doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00312.x>

- Pomorska-Mól, M., Pejsak, Z., 2012. Effects of antibiotics on acquired immunity in vivo--current state of knowledge. *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 583–588. <https://doi.org/10.2478/v10181-012-0089-0>
- Popoff, M.R., Boquet, P., 1988. *Clostridium spiroforme* toxin is a binary toxin which ADP-ribosylates cellular actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 1361–1368. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)80435-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80435-2)
- Pothoulakis, C., Gilbert, R.J., Cladaras, C., Castagliuolo, I., Semenza, G., Hitti, Y., Montcrief, J.S., Linevsky, J., Kelly, C.P., Nikulasson, S., Desai, H.P., Wilkins, T.D., LaMont, J.T., 1996. Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. *J. Clin. Invest.* 98, 641–649.
- Prabhu, V.S., Dubberke, E.R., Dorr, M.B., Elbasha, E., Cossrow, N., Jiang, Y., Marcella, S., 2018. Cost-effectiveness of Bezlotoxumab Compared With Placebo for the Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 66, 355–362. <https://doi.org/10.1093/cid/cix809>
- Pu, M., Cho, J.M., Cunningham, S.A., Behera, G.K., Becker, S., Amjad, T., Greenwood-Quaintance, K.E., Mendes-Soares, H., Jones-Hall, Y., Jeraldo, P.R., Chen, J., Dunny, G., Patel, R., Kashyap, P.C., 2021. Plasmid Acquisition Alters Vancomycin Susceptibility in *Clostridioides difficile*. *Gastroenterology* 160, 941-945.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.046>
- Purcell, E.B., McKee, R.W., McBride, S.M., Waters, C.M., Tamayo, R., 2012. Cyclic diguanylate inversely regulates motility and aggregation in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 194, 3307–3316. <https://doi.org/10.1128/JB.00100-12>
- Qa'Dan, M., Spyres, L.M., Ballard, J.D., 2000. pH-Induced Conformational Changes in *Clostridium difficile* Toxin B. *Infect. Immun.* 68, 2470–2474.
- Quraishi, M.N., Widlak, M., Bhala, N., Moore, D., Price, M., Sharma, N., Iqbal, T.H., 2017. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 46, 479–493. <https://doi.org/10.1111/apt.14201>
- Raeisi, H., Azimirad, M., Nabavi-Rad, A., Asadzadeh Aghdaei, H., Yadegar, A., Zali, M.R., 2022. Application of recombinant antibodies for treatment of *Clostridioides difficile* infection: Current status and future perspective. *Front. Immunol.* 13, 972930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972930>
- Ransom, E.M., Kaus, G.M., Tran, P.M., Ellermeier, C.D., Weiss, D.S., 2018. Multiple factors contribute to bimodal toxin gene expression in *Clostridioides (Clostridium) difficile*. *Mol. Microbiol.* 110, 533–549. <https://doi.org/10.1111/mmi.14107>
- Raymond, F., Ouameur, A.A., Déraspe, M., Iqbal, N., Gingras, H., Dridi, B., Leprohon, P., Plante, P.-L., Giroux, R., Bérubé, É., Frenette, J., Boudreau, D.K., Simard, J.-L., Chabot, I., Domingo, M.-C., Trottier, S., Boissinot, M., Huletsky, A., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., Corbeil, J., 2016. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *ISME J.* 10, 707–720. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.148>

- Razavi, B., Apisarnthanarak, A., Mundy, L.M., 2007. *Clostridium difficile*: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance. *Infection* 35, 300–307. <https://doi.org/10.1007/s15010-007-6113-0>
- Reeves, A.E., Koenigsnecht, M.J., Bergin, I.L., Young, V.B., 2012. Suppression of *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tracts of germfree mice inoculated with a murine isolate from the family Lachnospiraceae. *Infect. Immun.* 80, 3786–3794. <https://doi.org/10.1128/IAI.00647-12>
- Reeves, A.E., Theriot, C.M., Bergin, I.L., Huffnagle, G.B., Schloss, P.D., Young, V.B., 2011. The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* Infection. *Gut Microbes* 2, 145–158. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.3.16333>
- Richardson, K., 1991. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect. Immun.* 59, 2727–2736. <https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2727-2736.1991>
- Ridlon, J.M., Harris, S.C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., Hylemon, P.B., 2016. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7, 22–39. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1127483>
- Ridlon, J.M., Kang, D.-J., Hylemon, P.B., 2010. Isolation and characterization of a bile acid inducible 7 α -dehydroxylating operon in *Clostridium hylemonae* TN271. *Anaerobe* 16, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.05.004>
- Ridlon, J.M., Kang, D.-J., Hylemon, P.B., 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* 47, 241–259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200>
- Riggs, M.M., Sethi, A.K., Zabarsky, T.F., Eckstein, E.C., Jump, R.L.P., Donskey, C.J., 2007. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 45, 992–998. <https://doi.org/10.1086/521854>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G.A.D., Gasbarrini, A., Mele, M.C., 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., Palva, A., 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 97, 1166–1177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>
- Rocha, M.F., Soares, A.M., Flores, C.A., Steiner, T.S., Lyerly, D.M., Guerrant, R.L., Ribeiro, R.A., Lima, A.A., 1998. Intestinal secretory factor released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin 1beta. *Infect. Immun.* 66, 4910–4916. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.10.4910-4916.1998>
- Rodriguez, C., Taminiou, B., Avesani, V., Van Broeck, J., Delmée, M., Daube, G., 2014. Multilocus sequence typing analysis and antibiotic resistance of *Clostridium difficile* strains

- isolated from retail meat and humans in Belgium. *Food Microbiol.* 42, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.021>
- Rodriguez Diaz, C., Seyboldt, C., Rupnik, M., 2018. Non-human *C. difficile* Reservoirs and Sources: Animals, Food, Environment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1050, 227–243. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_13
- Rol, N., Favre, L., Benyacoub, J., Corthésy, B., 2012. The role of secretory immunoglobulin A in the natural sensing of commensal bacteria by mouse Peyer's patch dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 287, 40074–40082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405001>
- Rosenbusch, K.E., Bakker, D., Kuijper, E.J., Smits, W.K., 2012. *C. difficile* 630 Δ erm Spo0A regulates sporulation, but does not contribute to toxin production, by direct high-affinity binding to target DNA. *PloS One* 7, e48608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048608>
- Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2010. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12204–12209. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
- Rousseau, C., Lemée, L., Le Monnier, A., Poilane, I., Pons, J.-L., Collignon, A., 2011a. Prevalence and diversity of *Clostridium difficile* strains in infants. *J. Med. Microbiol.* 60, 1112–1118. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.029736-0>
- Rousseau, C., Levenez, F., Fouqueray, C., Doré, J., Collignon, A., Lepage, P., 2011b. *Clostridium difficile* colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. *J. Clin. Microbiol.* 49, 858–865. <https://doi.org/10.1128/JCM.01507-10>
- Rupnik, M., Kato, N., Grabnar, M., Kato, H., 2003. New Types of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive Strains among *Clostridium difficile* Isolates from Asia. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1118–1125. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1118-1125.2003>
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., Gerding, D.N., 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 526–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>
- Ryan, A., Lynch, M., Smith, S.M., Amu, S., Nel, H.J., McCoy, C.E., Dowling, J.K., Draper, E., O'Reilly, V., McCarthy, C., O'Brien, J., Eidhin, D.N., O'Connell, M.J., Keogh, B., Morton, C.O., Rogers, T.R., Fallon, P.G., O'Neill, L.A., Kelleher, D., Loscher, C.E., 2011. A Role for TLR4 in *Clostridium difficile* Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. *PLOS Pathog.* 7, e1002076. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002076>
- Saha, S., Kapoor, S., Tariq, R., Schuetz, A.N., Tosh, P.K., Pardi, D.S., Khanna, S., 2019. Increasing antibiotic resistance in *Clostridioides difficile*: A systematic review and meta-analysis. *Anaerobe* 58, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102072>
- Sambol, S.P., Merrigan, M.M., Tang, J.K., Johnson, S., Gerding, D.N., 2002. Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters. *J. Infect. Dis.* 186, 1781–1789. <https://doi.org/10.1086/345676>
- Sambol, S.P., Skinner, A.M., Serna-Perez, F., Owen, B., Gerding, D.N., Johnson, S., 2023. Effective Colonization by Nontoxicogenic *Clostridioides difficile* REA Strain M3 (NTCD-M3) Spores

following Treatment with Either Fidaxomicin or Vancomycin. *Microbiol. Spectr.* 11, e0051723. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00517-23>

- Sánchez-Hurtado, K., Corretge, M., Mutlu, E., McIlhagger, R., Starr, J.M., Poxton, I.R., 2008. Systemic antibody response to *Clostridium difficile* in colonized patients with and without symptoms and matched controls. *J. Med. Microbiol.* 57, 717–724. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47713-0>
- Sandolo, C., Péchiné, S., Le Monnier, A., Hoys, S., Janoir, C., Coviello, T., Alhaique, F., Collignon, A., Fattal, E., Tsapis, N., 2011. Encapsulation of Cwp84 into pectin beads for oral vaccination against *Clostridium difficile*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 566–573. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.05.011>
- Sannasiddappa, T.H., Lund, P.A., Clarke, S.R., 2017. In Vitro Antibacterial Activity of Unconjugated and Conjugated Bile Salts on *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* 8, 1581. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01581>
- Sára, M., Sleytr, U.B., 2000. S-Layer proteins. *J. Bacteriol.* 182, 859–868. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.859-868.2000>
- Saujet, L., Monot, M., Dupuy, B., Soutourina, O., Martin-Verstraete, I., 2011. The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 193, 3186–3196. <https://doi.org/10.1128/JB.00272-11>
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.-D., Wehland, J., Aktories, K., 2009. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog.* 5, e1000626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000626>
- Scully, B.E., 1988. Metronidazole. *Med. Clin. North Am.* 72, 613–621. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30761-1](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30761-1)
- Seekatz, A.M., Safdar, N., Khanna, S., 2022. The role of the gut microbiome in colonization resistance and recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 15, 17562848221134396. <https://doi.org/10.1177/17562848221134396>
- Seekatz, A.M., Young, V.B., 2014. *Clostridium difficile* and the microbiota. *J. Clin. Invest.* 124, 4182–4189. <https://doi.org/10.1172/JCI72336>
- Segal, J.P., Mullish, B.H., Quraishi, M.N., Iqbal, T., Marchesi, J.R., Sokol, H., 2020. Mechanisms underpinning the efficacy of faecal microbiota transplantation in treating gastrointestinal disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 13, 1756284820946904. <https://doi.org/10.1177/1756284820946904>

- Semenyuk, E.G., Laning, M.L., Foley, J., Johnston, P.F., Knight, K.L., Gerding, D.N., Driks, A., 2014. Spore Formation and Toxin Production in *Clostridium difficile* Biofilms. PLoS ONE 9, e87757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087757>
- Semenyuk, E.G., Poroyko, V.A., Johnston, P.F., Jones, S.E., Knight, K.L., Gerding, D.N., Driks, A., 2015. Analysis of Bacterial Communities during *Clostridium difficile* Infection in the Mouse. Infect. Immun. 83, 4383–4391. <https://doi.org/10.1128/IAI.00145-15>
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol. 14, e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Setlow, P., 2014. Spore Resistance Properties. Microbiol. Spectr. 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012>
- Sheldon, E., Kitchin, N., Peng, Y., Eiden, J., Gruber, W., Johnson, E., Jansen, K.U., Pride, M.W., Pedneault, L., 2016. A phase 1, placebo-controlled, randomized study of the safety, tolerability, and immunogenicity of a *Clostridium difficile* vaccine administered with or without aluminum hydroxide in healthy adults. Vaccine 34, 2082–2091. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.010>
- Shen, N.T., Maw, A., Tmanova, L.L., Pino, A., Ancy, K., Crawford, C.V., Simon, M.S., Evans, A.T., 2017. Timely Use of Probiotics in Hospitalized Adults Prevents *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review With Meta-Regression Analysis. Gastroenterology 152, 1889–1900.e9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.003>
- Shimamoto, S., Moriyama, R., Sugimoto, K., Miyata, S., Makino, S., 2001. Partial characterization of an enzyme fraction with protease activity which converts the spore peptidoglycan hydrolase (SleC) precursor to an active enzyme during germination of *Clostridium perfringens* S40 spores and analysis of a gene cluster involved in the activity. J. Bacteriol. 183, 3742–3751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3742-3751.2001>
- Shin, J.H., Chaves-Olarte, E., Warren, C.A., 2016. *Clostridium difficile* Infection. Microbiol. Spectr. 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0007-2015>
- Shrestha, R., Sorg, J.A., 2018. Hierarchical recognition of amino acid co-germinants during *Clostridioides difficile* spore germination. Anaerobe 49, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.001>
- Siegwald, L., 2017. Solutions d'amélioration des études de métagénomique ciblée.
- Sillner, N., Walker, A., Koch, W., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., 2018. Metformin impacts cecal bile acid profiles in mice. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 1083, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.029>
- Silva, A.J., Benitez, J.A., 2006. A *Vibrio cholerae* relaxed (*relA*) mutant expresses major virulence factors, exhibits biofilm formation and motility, and colonizes the suckling mouse intestine. J. Bacteriol. 188, 794–800. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.794-800.2006>
- Simango, C., Uladi, S., 2014. Detection of *Clostridium difficile* diarrhoea in Harare, Zimbabwe. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 108, 354–357. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru042>

- Sinclair, J., West, N.P., Cox, A.J., 2023. Comparison of four DNA extraction methods for 16s rRNA microbiota profiling of human faecal samples. BMC Res. Notes 16, 169. <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06451-7>
- Sivsammie, G., Sims, H.V., 1990. Presumptive identification of *Clostridium difficile* by detection of p-cresol in prepared peptone yeast glucose broth supplemented with p-hydroxyphenylacetic acid. J. Clin. Microbiol. 28, 1851–1853. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.8.1851-1853.1990>
- Slimings, C., Riley, T.V., 2014. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis. J. Antimicrob. Chemother. 69, 881–891. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt477>
- Smith, A.B., Jenior, M.L., Keenan, O., Hart, J.L., Specker, J., Abbas, A., Rangel, P.C., Di, C., Green, J., Bustin, K.A., Gaddy, J.A., Nicholson, M.R., Laut, C., Kelly, B.J., Matthews, M.L., Evans, D.R., Van Tyne, D., Furth, E.E., Papin, J.A., Bushman, F.D., Erlichman, J., Baldassano, R.N., Silverman, M.A., Dunny, G.M., Prentice, B.M., Skaar, E.P., Zackular, J.P., 2022. Enterococci enhance *Clostridioides difficile* pathogenesis. Nature 611, 780–786. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05438-x>
- Smith, L.Ds., King, E.O., 1962. Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. J. Bacteriol. 84, 65–67. <https://doi.org/10.1128/jb.84.1.65-67.1962>
- Smits, W.K., Lyras, D., Lacy, D.B., Wilcox, M.H., Kuijper, E.J., 2016. *Clostridium difficile* infection. Nat. Rev. Dis. Primer 2, 16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>
- Snoeck, V., Peters, I.R., Cox, E., 2006. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. Vet. Res. 37, 455–467. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006010>
- Snyder, M.L., 1940. The Normal Fecal Flora of Infants between Two Weeks and One Year of Age: I. Serial Studies. J. Infect. Dis. 66, 1–16. <https://doi.org/10.1093/infdis/66.1.1>
- Soavelomandroso, A.P., Gaudin, F., Hoys, S., Nicolas, V., Vedantam, G., Janoir, C., Bouttier, S., 2017. Biofilm Structures in a Mono-Associated Mouse Model of *Clostridium difficile* Infection. Front. Microbiol. 8.
- Solbach, P., Chhatwal, P., Woltemate, S., Tacconelli, E., Buhl, M., Gerhard, M., Thoeringer, C.K., Vehreschild, M.J.G.T., Jazmati, N., Rupp, J., Manns, M.P., Bachmann, O., Suerbaum, S., 2018. BaiCD gene cluster abundance is negatively correlated with *Clostridium difficile* infection. PLoS ONE 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196977>
- Solomon, K., Martin, A.J., O'Donoghue, C., Chen, X., Fenelon, L., Fanning, S., Kelly, C.P., Kyne, L., 2013. Mortality in patients with *Clostridium difficile* infection correlates with host pro-inflammatory and humoral immune responses. J. Med. Microbiol. 62, 1453–1460. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.058479-0>
- Sonenshein, A.L., 2000. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. Curr. Opin. Microbiol. 3, 561–566. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00141-7)
- Song, J.H., Kim, Y.S., 2019. Recurrent *Clostridium difficile* Infection: Risk Factors, Treatment, and Prevention. Gut Liver 13, 16–24. <https://doi.org/10.5009/gnl18071>

- Sorg, J.A., Sonenshein, A.L., 2009. Chenodeoxycholate Is an Inhibitor of *Clostridium difficile* Spore Germination. *J. Bacteriol.* 191, 1115–1117. <https://doi.org/10.1128/JB.01260-08>
- Sorg, J.A., Sonenshein, A.L., 2008. Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *J. Bacteriol.* 190, 2505–2512. <https://doi.org/10.1128/JB.01765-07>
- Stabler, R.A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T.D., Sebahia, M., Quail, M.A., Rose, G., Gerding, D.N., Gibert, M., Popoff, M.R., Parkhill, J., Dougan, G., Wren, B.W., 2009. Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol.* 10, R102. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r102>
- Steenbergen, J. van, Debast, S., Kregten, E. van, Berg, R. van den, Notermans, D., Kuijper, E., 2005. Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Wkly. Releases 1997–2007* 10, 2745. <https://doi.org/10.2807/esw.10.28.02745-en>
- Stewart, D.B., Berg, A., Hegarty, J., 2013. Predicting recurrence of *C. difficile* colitis using bacterial virulence factors: binary toxin is the key. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 17, 118–124; discussion p.124-125. <https://doi.org/10.1007/s11605-012-2056-6>
- Stout, M.J., Conlon, B., Landeau, M., Lee, I., Bower, C., Zhao, Q., Roehl, K.A., Nelson, D.M., Macones, G.A., Mysorekar, I.U., 2013. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 208, 226.e1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.01.018>
- Su, G.L., Ko, C.W., Bercik, P., Falck-Ytter, Y., Sultan, S., Weizman, A.V., Morgan, R.L., 2020. AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* 159, 697–705. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.059>
- Suez, J., Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S., Zur, M., Regev-Lehavi, D., Brik, R.B.-Z., Federici, S., Horn, M., Cohen, Y., Moor, A.E., Zeevi, D., Korem, T., Kotler, E., Harmelin, A., Itzkovitz, S., Maharshak, N., Shibolet, O., Pevsner-Fischer, M., Shapiro, H., Sharon, I., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E., 2018. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* 174, 1406–1423.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.047>
- Sun, X., Wang, H., Zhang, Y., Chen, K., Davis, B., Feng, H., 2011. Mouse relapse model of *Clostridium difficile* infection. *Infect. Immun.* 79, 2856–2864. <https://doi.org/10.1128/IAI.01336-10>
- Sung, J.Y., Shaffer, E.A., Costerton, J.W., 1993. Antibacterial activity of bile salts against common biliary pathogens. Effects of hydrophobicity of the molecule and in the presence of phospholipids. *Dig. Dis. Sci.* 38, 2104–2112. <https://doi.org/10.1007/BF01297092>
- Swick, M.C., Koehler, T.M., Driks, A., 2016. Surviving Between Hosts: Sporulation and Transmission. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015>

- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., Hale, L.-P., 2005. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J. Gastroenterol.* 11, 1131–1140. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i8.1131>
- Tachon, M., Cattoen, C., Blanckaert, K., Poujol, I., Carbonne, A., Barbut, F., Petit, J.C., Coignard, B., 2006. First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 11, E060504.1. <https://doi.org/10.2807/esw.11.18.02951-en>
- Taggart, M.G., Snelling, W.J., Naughton, P.J., Ragione, R.M.L., Dooley, J.S.G., Ternan, N.G., 2021. Biofilm regulation in *Clostridioides difficile*: Novel systems linked to hypervirulence. *PLOS Pathog.* 17, e1009817. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009817>
- Takeoka, A., Takumi, K., Koga, T., Kawata, T., 1991. Purification and characterization of S layer proteins from *Clostridium difficile* GAI 0714. *J. Gen. Microbiol.* 137, 261–267. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-2-261>
- Tallant, T., Deb, A., Kar, N., Lupica, J., de Veer, M.J., DiDonato, J.A., 2004. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF- κ B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 4, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-33>
- Tam, J., Icho, S., Utama, E., Orrell, K.E., Gómez-Biagi, R.F., Theriot, C.M., Kroh, H.K., Rutherford, S.A., Lacy, D.B., Melnyk, R.A., 2020. Intestinal bile acids directly modulate the structure and function of *C. difficile* TcdB toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 6792–6800. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916965117>
- Tan, K.S., Wee, B.Y., Song, K.P., 2001. Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 50, 613–619. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-613>
- Tannock, G.W., Munro, K., Taylor, C., Lawley, B., Young, W., Byrne, B., Emery, J., Louie, T., 2010. A new macrocyclic antibiotic, fidaxomicin (OPT-80), causes less alteration to the bowel microbiota of *Clostridium difficile*-infected patients than does vancomycin. *Microbiol. Read. Engl.* 156, 3354–3359. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042010-0>
- Tao, L., Tian, S., Zhang, J., Liu, Z., Robinson-McCarthy, L., Miyashita, S.-I., Breault, D.T., Gerhard, R., Oottamasathien, S., Whelan, S.P.J., Dong, M., 2019. Sulfated glycosaminoglycans and low-density lipoprotein receptor contribute to *Clostridium difficile* toxin A entry into cells. *Nat. Microbiol.* 4, 1760–1769. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0464-z>
- Tao, L., Zhang, J., Meraner, P., Tovaglieri, A., Wu, X., Gerhard, R., Zhang, X., Stallcup, W.B., Miao, J., He, X., Hurdle, J.G., Breault, D.T., Brass, A.L., Dong, M., 2016. Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. *Nature* 538, 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature19799>
- Tasteyre, A., Barc, M.C., Collignon, A., Boureau, H., Karjalainen, T., 2001a. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun.* 69, 7937–7940. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7937-7940.2001>

- Tasteyre, A., Barc, M.-C., Karjalainen, T., Dodson, P., Hyde, S., Bourlioux, P., Borriello, P., 2000. A *Clostridium difficile* gene encoding flagellin. *Microbiol. Read. Engl.* 146 (Pt 4), 957–966. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-4-957>
- Tasteyre, A., Karjalainen, T., Avesani, V., Delmée, M., Collignon, A., Bourlioux, P., Barc, M.-C., 2001b. Molecular Characterization of *fliD* Gene Encoding Flagellar Cap and Its Expression among *Clostridium difficile* Isolates from Different Serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1178–1183. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.1178-1183.2001>
- Tedjo, D.I., Jonkers, D.M.A.E., Savelkoul, P.H., Masclee, A.A., van Best, N., Pierik, M.J., Penders, J., 2015. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PloS One* 10, e0126685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126685>
- Teneberg, S., Lönnroth, I., Torres López, J.F., Galili, U., Halvarsson, M.O., Angström, J., Karlsson, K.A., 1996. Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal alpha 3 Gal beta 4 GlcNAc beta-binding *Clostridium difficile* toxin A, human natural anti alpha-galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* 6, 599–609. <https://doi.org/10.1093/glycob/6.6.599>
- Thanissery, R., Winston, J.A., Theriot, C.M., 2017. Inhibition of spore germination, growth, and toxin activity of clinically relevant *C. difficile* strains by gut microbiota derived secondary bile acids. *Anaerobe* 45, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.03.004>
- Theriot, C.M., Bowman, A.A., Young, V.B., 2016. Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere* 1. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00045-15>
- Theriot, C.M., Koenigsnecht, M.J., Carlson, P.E., Hatton, G.E., Nelson, A.M., Li, B., Huffnagle, G.B., Li, J., Young, V.B., 2014. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat. Commun.* 5, 3114. <https://doi.org/10.1038/ncomms4114>
- Theriot, C.M., Schumacher, C.A., Bassis, C.M., Seekatz, A.M., Young, V.B., 2015. Effects of tigecycline and vancomycin administration on established *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1596–1604. <https://doi.org/10.1128/AAC.04296-14>
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F., 2012. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tian, S., Xiong, X., Zeng, J., Wang, S., Tremblay, B.J.-M., Chen, Peng, Chen, B., Liu, M., Chen, Pengsheng, Sheng, K., Zeve, D., Qi, W., Breault, D.T., Rodríguez, C., Gerhard, R., Jin, R., Doxey, A.C., Dong, M., 2022. Identification of TFPI as a receptor reveals recombination-driven receptor switching in *Clostridioides difficile* toxin B variants. *Nat. Commun.* 13, 6786. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33964-9>
- Trubiano, J.A., Cheng, A.C., Korman, T.M., Roder, C., Campbell, A., May, M.L.A., Blyth, C.C., Ferguson, J.K., Blackmore, T.K., Riley, T.V., Athan, E., 2016. Australasian Society of

- Infectious Diseases updated guidelines for the management of *Clostridium difficile* infection in adults and children in Australia and New Zealand. *Intern. Med. J.* 46, 479–493. <https://doi.org/10.1111/imj.13027>
- Tucker, K.D., Wilkins, T.D., 1991. Toxin A of *Clostridium difficile* binds to the human carbohydrate antigens I, X, and Y. *Infect. Immun.* 59, 73–78. <https://doi.org/10.1128/iai.59.1.73-78.1991>
- Tumbarello, M., Fiori, B., Trecarichi, E.M., Posteraro, P., Losito, A.R., De Luca, A., Sanguinetti, M., Fadda, G., Cauda, R., Posteraro, B., 2012. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PloS One* 7, e33705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033705>
- Twine, S.M., Reid, C.W., Aubry, A., McMullin, D.R., Fulton, K.M., Austin, J., Logan, S.M., 2009. Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 191, 7050–7062. <https://doi.org/10.1128/JB.00861-09>
- van Leeuwen, H.C., Bakker, D., Steindel, P., Kuijper, E.J., Corver, J., 2013. *Clostridium difficile* TcdC protein binds four-stranded G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* 41, 2382–2393. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1448>
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Visser, C.E., Kuijper, E.J., Bartelsman, J.F.W.M., Tijssen, J.G.P., Speelman, P., Dijkgraaf, M.G.W., Keller, J.J., 2013. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* 368, 407–415. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205037>
- van Opstal, E., Kolling, G.L., Moore, J.H., II, Coquery, C.M., Wade, N.S., Loo, W.M., Bolick, D.T., Shin, J.H., Erickson, L.D., Warren, C.A., 2016. Vancomycin Treatment Alters Humoral Immunity and Intestinal Microbiota in an Aged Mouse Model of *Clostridium difficile* Infection. *J. Infect. Dis.* 214, 130–139. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw071>
- van Prehn, J., Reigadas, E., Vogelzang, E.H., Bouza, E., Hristea, A., Guery, B., Krutova, M., Norén, T., Allerberger, F., Coia, J.E., Goorhuis, A., van Rossen, T.M., Ooijevaar, R.E., Burns, K., Scharvik Olesen, B.R., Tschudin-Sutter, S., Wilcox, M.H., Vehreschild, M.J.G.T., Fitzpatrick, F., Kuijper, E.J., Guideline Committee of the European Study Group on Clostridioides difficile, 2021. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27 Suppl 2, S1–S21. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>
- van Tetering, G., Evers, M., Chan, C., Stip, M., Leusen, J., 2020. Fc Engineering Strategies to Advance IgA Antibodies as Therapeutic Agents. *Antibodies Basel Switz.* 9, 70. <https://doi.org/10.3390/antib9040070>
- Vedantam, G., Clark, A., Chu, M., McQuade, R., Mallozzi, M., Viswanathan, V.K., 2012. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. *Gut Microbes* 3, 121–134. <https://doi.org/10.4161/gmic.19399>
- Vehreschild, M.J.G.T., Ducher, A., Louie, T., Cornely, O.A., Feger, C., Dane, A., Varastet, M., Vitry, F., de Gunzburg, J., Andremont, A., Mentré, F., Wilcox, M.H., 2022. An open randomized multicentre Phase 2 trial to assess the safety of DAV132 and its efficacy to protect gut

- microbiota diversity in hospitalized patients treated with fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 77, 1155–1165. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab474>
- Venugopal, A.A., Johnson, S., 2012. Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic approved for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 54, 568–574. <https://doi.org/10.1093/cid/cir830>
- Vickers, R., Robinson, N., Best, E., Echols, R., Tillotson, G., Wilcox, M., 2015. A randomised phase 1 study to investigate safety, pharmacokinetics and impact on gut microbiota following single and multiple oral doses in healthy male subjects of SMT19969, a novel agent for *Clostridium difficile* infections. *BMC Infect. Dis.* 15, 91. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0759-5>
- Vickers, R.J., Tillotson, G.S., Nathan, R., Hazan, S., Pullman, J., Lucasti, C., Deck, K., Yacyshyn, B., Maliakkal, B., Pesant, Y., Tejura, B., Roblin, D., Gerding, D.N., Wilcox, M.H., CoDIFy study group, 2017. Efficacy and safety of ridinilazole compared with vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a phase 2, randomised, double-blind, active-controlled, non-inferiority study. *Lancet Infect. Dis.* 17, 735–744. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30235-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30235-9)
- Villano, S.A., Seiberling, M., Tatarowicz, W., Monnot-Chase, E., Gerding, D.N., 2012. Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5224–5229. <https://doi.org/10.1128/AAC.00913-12>
- Viscidi, R., Laughon, B.E., Yolken, R., Bo-Linn, P., Moench, T., Ryder, R.W., Bartlett, J.G., 1983. Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 148, 93–100. <https://doi.org/10.1093/infdis/148.1.93>
- von Eichel-Streiber, A., Paik, W., Knight, K., Gisch, K., Nadjafi, K., Decker, C., Bosnjak, O., Cheknis, A., Johnson, S., von Eichel-Streiber, C., 2016. Induction of antitoxin responses in *Clostridium-difficile*-infected patients compared to healthy blood donors. *Anaerobe* 41, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.07.001>
- von Eichel-Streiber, C., Laufenberg-Feldmann, R., Sartingen, S., Schulze, J., Sauerborn, M., 1992. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* MGG 233, 260–268. <https://doi.org/10.1007/BF00587587>
- Voth, D.E., Ballard, J.D., 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 247–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>
- Vuotto, C., Moura, I., Barbanti, F., Donelli, G., Spigaglia, P., 2016. Subinhibitory concentrations of metronidazole increase biofilm formation in *Clostridium difficile* strains. *Pathog. Dis.* 74, ftv114. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv114>
- Waligora, A.J., Hennequin, C., Mullany, P., Bourlioux, P., Collignon, A., Karjalainen, T., 2001. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties. *Infect. Immun.* 69, 2144–2153. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2144-2153.2001>

- Walker, A.W., Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J., 2014. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 22, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.03.001>
- Wang, J.-W., Kuo, C.-H., Kuo, F.-C., Wang, Y.-K., Hsu, W.-H., Yu, F.-J., Hu, H.-M., Hsu, P.-I., Wang, J.-Y., Wu, D.-C., 2019. Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* 118 Suppl 1, S23–S31. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.08.011>
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E., McDonald, L.C., 2005. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet Lond. Engl.* 366, 1079–1084. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67420-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67420-X)
- Warny, M., Vaerman, J.P., Avesani, V., Delmée, M., 1994. Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection. *Infect. Immun.* 62, 384–389. <https://doi.org/10.1128/iai.62.2.384-389.1994>
- Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S., Weese, S.J., 2017. Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection? *J. Appl. Microbiol.* 122, 542–553. <https://doi.org/10.1111/jam.13338>
- Wells, J.E., Hylemon, P.B., 2000. Identification and Characterization of a Bile Acid 7 α -Dehydroxylation Operon in *Clostridium* sp. Strain TO-931, a Highly Active 7 α -Dehydroxylating Strain Isolated from Human Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1107–1113. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1107-1113.2000>
- Wilcox, M.H., Gerding, D.N., Poxton, I.R., Kelly, C., Nathan, R., Birch, T., Cornely, O.A., Rahav, G., Bouza, E., Lee, C., Jenkin, G., Jensen, W., Kim, Y.-S., Yoshida, J., Gabryelski, L., Pedley, A., Eves, K., Tipping, R., Guris, D., Kartsonis, N., Dorr, M.-B., 2017. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N. Engl. J. Med.* 376, 305–317. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602615>
- Williams, A.C., Galley, H.F., Watt, A.M., Webster, N.R., 2005. Differential effects of three antibiotics on T helper cell cytokine expression. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 502–506. <https://doi.org/10.1093/jac/dki251>
- Wilson, K.H., Kennedy, M.J., Fekety, F.R., 1982. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 15, 443–446.
- Wilson, R., Beerbaum, P., Giglio, S., 2015. Community and hospital acquired *Clostridium difficile* in South Australia - ribotyping of isolates and a comparison of laboratory detection methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 33–36. <https://doi.org/10.1111/lam.12335>
- Woodmansey, E.J., McMurdo, M.E.T., Macfarlane, G.T., Macfarlane, S., 2004. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6113–6122. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6113-6122.2004>
- Wu, Z., Xu, Q., Gu, S., Chen, Y., Lv, L., Zheng, B., Wang, Q., Wang, K., Wang, S., Xia, J., Yang, L., Bian, X., Jiang, X., Zheng, L., Li, L., 2022. *Akkermansia muciniphila* Ameliorates

Clostridioides difficile Infection in Mice by Modulating the Intestinal Microbiome and Metabolites. *Front. Microbiol.* 13, 841920. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.841920>

- Wullt, M., Norén, T., Ljungh, Å., Åkerlund, T., 2012. IgG Antibody Response to Toxins A and B in Patients with *Clostridium difficile* Infection. *Clin. Vaccine Immunol.* CVI 19, 1552. <https://doi.org/10.1128/CVI.00210-12>
- Xiao, L., Feng, Q., Liang, S., Sonne, S.B., Xia, Z., Qiu, X., Li, X., Long, H., Zhang, J., Zhang, D., Liu, C., Fang, Z., Chou, J., Glanville, J., Hao, Q., Kotowska, D., Colding, C., Licht, T.R., Wu, D., Yu, J., Sung, J.J.Y., Liang, Q., Li, J., Jia, H., Lan, Z., Tremaroli, V., Dworzynski, P., Nielsen, H.B., Bäckhed, F., Doré, J., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., Lin, J.C., Arumugam, M., Wang, J., Madsen, L., Kristiansen, K., 2015. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat. Biotechnol.* 33, 1103–1108. <https://doi.org/10.1038/nbt.3353>
- Xu, B., Wu, X., Gong, Y., Cao, J., 2021. IL-27 induces LL-37/CRAMP expression from intestinal epithelial cells: implications for immunotherapy of *Clostridioides difficile* infection. *Gut Microbes* 13, 1968258. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1968258>
- Yamakawa, K., Karasawa, T., Ikoma, S., Nakamura, S., 1996. Enhancement of *Clostridium difficile* toxin production in biotin-limited conditions. *J. Med. Microbiol.* 44, 111–114. <https://doi.org/10.1099/00222615-44-2-111>
- Yang, G., Zhou, B., Wang, J., He, X., Sun, X., Nie, W., Tzipori, S., Feng, H., 2008. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A and B in *Bacillus megaterium*. *BMC Microbiol.* 8, 192. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-192>
- Yao, R., Burr, D.H., Doig, P., Trust, T.J., Niu, H., Guerry, P., 1994. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 14, 883–893. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01324.x>
- Yoshino, Y., Kitazawa, T., Ikeda, M., Tatsuno, K., Yanagimoto, S., Okugawa, S., Yotsuyanagi, H., Ota, Y., 2013. *Clostridium difficile* flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sci.* 92, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.11.017>
- Yu, H.Y., Meade, A., Liu, S.J., 2019. Phylogeny of *Clostridium spp.* Based on Conservative Genes and Comparisons with Other Trees. *Microbiology* 88, 469–478. <https://doi.org/10.1134/S002626171904012X>
- Yuan, P., Zhang, H., Cai, C., Zhu, S., Zhou, Y., Yang, X., He, R., Li, C., Guo, S., Li, S., Huang, T., Perez-Cordon, G., Feng, H., Wei, W., 2015. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell Res.* 25, 157–168. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.169>
- Yutin, N., Galperin, M.Y., 2013. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* 15, 2631–2641. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12173>
- Zar, F.A., Bakkanagari, S.R., Moorthi, K.M.L.S.T., Davis, M.B., 2007. A Comparison of Vancomycin and Metronidazole for the Treatment of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea,

Stratified by Disease Severity. Clin. Infect. Dis. 45, 302–307.
<https://doi.org/10.1086/519265>

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinforma. Oxf. Engl. 30, 614–620.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>

Zhang, L., Dong, D., Jiang, C., Li, Z., Wang, X., Peng, Y., 2015. Insight into alteration of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection and asymptomatic *C. difficile* colonization. Anaerobe 34, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.03.008>

Zhang, Y., Shi, L., Li, S., Yang, Zhiyong, Standley, C., Yang, Zhong, ZhuGe, R., Savidge, T., Wang, X., Feng, H., 2013. A segment of 97 amino acids within the translocation domain of *Clostridium difficile* toxin B is essential for toxicity. PloS One 8, e58634.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058634>

Zhao, Y., Wu, J., Li, J.V., Zhou, N.-Y., Tang, H., Wang, Y., 2013. Gut microbiota composition modifies fecal metabolic profiles in mice. J. Proteome Res. 12, 2987–2999.
<https://doi.org/10.1021/pr400263n>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70, 2782–2858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zou, J., Chassaing, B., Singh, V., Pellizzon, M., Ricci, M., Fythe, M.D., Kumar, M.V., Gewirtz, A.T., 2018. Fiber-Mediated Nourishment of Gut Microbiota Protects against Diet-Induced Obesity by Restoring IL-22-Mediated Colonic Health. Cell Host Microbe 23, 41–53.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.003>

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Characterization of natural systemic and mucosal humoral immune responses to *Clostridioides difficile* infection in mice (article en preparation)

Characterization of natural systemic and mucosal humoral immune responses to *Clostridioides difficile* infection in mice

A. Mizrahi^{1,2}; G. Péan de Ponfilly^{1,2}; D. Sapa²; A. Suau Pernet³; I. Mangin³; A. Balardia²; S. Hoys²; B. Pilmis^{1,2}; S. Lambert²; A. Brosse²; A. Le Monnier^{1,2}

¹*Service de Microbiologie Clinique, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Paris, France*

²*Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Micalis, Jouy-en-Josas, France*

³*Conservatoire national des arts et métiers, Paris, France*

Corresponding author:

Dr Assaf Mizrahi, PharmD, PhD

Email : amizrahi@ghpsj.fr

Postal address: Service de Microbiologie clinique, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, 185, rue Raymond Losserand, 75014 Paris, France

Tel: +33144127030

Fax: +33144123513

Abstract

Our main objective was to establish the kinetic of appearance of humoral (IgG, IgM) and mucosal (IgA) against TcdA, TcdB, SlpA and FliC after a first *C. difficile* infection (CDI) in a mice model. We also determined the gut microbiota modification that led to CDI. 630 Δ erm and non-toxigenic strain (ATCC 43602) were used for challenge. We sacrificed animals at different end-points around infection (Days -6, 2, 7, 14, 21, 28, and 56). Blood, feces, and fecal content were obtained. We evaluated IgM, and IgG against TcdA, TcdB, SlpA, and FliC on blood samples and IgA against the same antigens in fecal content. Gut microbiota was evaluated on a subset of 4 mice. A mean weight loss of 15 % occurred in mice challenged by the 630 Δ erm. Augmentation of Proteobacteria and diminution of Actinobacteria was observed following the antibiotic protocol. We observed an elevation of IgM anti-TcdA, and TcdB as soon as day 7 after the challenge. IgG raised after 21 days and IgA anti-toxins were secreted in fecal content. None anti-toxins antibodies were observed in the non-toxigenic group. We did not observe anti-SlpA and anti-FliC IgG, IgM or IgA. Reinfection seemed to protect

against clinical signs of CDI. In our model, gut dysbiosis induced by the antibiotics was marked by an augmentation of Proteobacteria and a diminution of Actinobacteria. Development of systemic IgM, IgG, and mucosal IgA directed against TcdA and TcdB are correlated with protection against a secondary challenge.

Keywords: immune response, colonization factor, toxins, gut microbiota

Introduction

Clostridioides difficile, a Gram-positive, anaerobic, and spore-forming opportunistic bacterium, is the etiological agent of gastrointestinal infections (CDI) in humans, ranging from asymptomatic colonization to severe diarrhea with potential complications [1]. *C. difficile* was mostly associated with healthcare settings but epidemiology is changing and community-acquired CDI accounts for almost 48% of annual cases in the United States [2]. Despite the availability of revised clinical practice guidelines for CDI, including novel treatments, CDI continues to be a major threat to the healthcare system worldwide [3]. Previous use of broad-spectrum antibiotics suppresses the intestinal microbiota, allowing ingested *C. difficile* spores to germinate, proliferate, colonize using non-toxins factors such as SlpA or FliC [4,5]. Disease manifestation occur after the production of the main virulence factors (*i.e.*, exotoxins TcdA and TcdB), which cause damage and inflammation of the intestinal tissue [6].

Standard antibiotic treatments for CDI include the use of fidaxomicin and vancomycin, although these antibiotics resolve the clinical manifestations of the disease, recurrent CDI rate does not appear to drop below 10% [7]. Although the main factor causing recurrent CDI is the persistent disruption of the intestinal microbiota [8], elaboration of an immune response to *C. difficile* plays a key role in the pathophysiological process and patient outcome [9,10,10–16]. However, little is known about the development of a protective immune response after a primary CDI without previous colonization. Similarly, studies evaluating the role of antibodies directed against *C. difficile* surface proteins (SlpA, FliC) seem to show a protective role of SlpA and FliC IgG but without being well studied after a primary CDI [17–19].

As humans are colonized very early in childhood with the appearance of antibodies from the first months of life [14,20], serological studies in humans cannot provide an answer to this question and must be carried out on animal models.

Currently, several types of animal models have been developed to study various aspects of CDI, such as colonization, virulence, transmission, and recurrence [21]

Of all of the existing models, the mouse model is the most widely used due to improvements in the methods to induce *C. difficile*-susceptibility as well as the existence of greater availability of mouse-specific reagents available to study host response to the infection [21]. Apparently, in a mouse model, the severity of CDI depends on the antibiotic treatment and the infected strain used [23]. For example, animals treated with an antibiotic cocktail and clindamycin before *C. difficile* challenge, can either remain clinically well [24] or become clinically ill and moribund within 2-4 days [23]. We developed a model adapted from Chen *et al.* using C57Bl/6 mice infected by the 630 Δ erm strain [17,18]. This model is reflecting at best the pathophysiology of CDI in humans by leading to a moderate mortality and a cure without using antibiotics to cure CDI [24].

Based on this rationale, our main objectives were to establish the kinetics of appearance of serum antibodies (IgG and IgM) toward toxins (TcdA and TcdB) and surface proteins (SlpA and FliC) following a primary and a recurrent CDI in a naïve host as well as describing the dysbiosis leading to CDI in this model. Our secondary objectives were to evaluate the gut microbiota modification leading to CDI as well as evaluate the immune response to a non-toxigenic strain.

Materials and Methods

1. Animal experiments

Six weeks old female C57BL/6 (Charles River's, Saint Germain Nuelles, France) were caged after checking of the absence of *C. difficile* colonization. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments n° 26 of the University of Paris-Sud and authorized by the French Ministry of Research (APAFIS#23414-2019121910116284).

The protocol of induced dysbiosis was adapted from Chen *et al.* [23]. An antibiotic mixture was administered in drinking water during the first three days of the experiment (Figure 1). The antibiotic mixture was composed of kanamycin (0.4mg/ml; Sigma Aldrich), gentamicin (0.035 mg/ml; Panpharma), colistin (850U/ml; Sanofi), metronidazole (0.215 mg/ml; Braun) and vancomycin (0.045 mg/ml; Mylan). Following days of the experiment, the antibiotic mixture was replaced by water. On day 6, animals received a single dose of clindamycin (10mg/kg) intraperitoneally. Mice were

challenged by oral administration of 10^5 UFC/mL vegetative forms of 630 Δ erm *C. difficile* the day after.

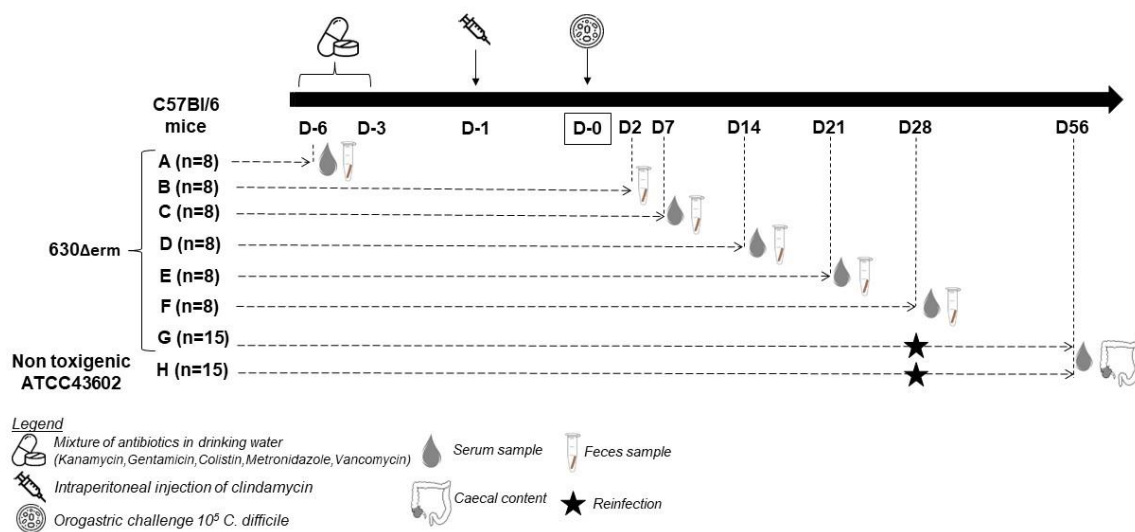


Figure 1: Experimental condition and protocol of infection with sample protocol
Mice from the groups G and H were re-infected at D28 following the same protocol

Inoculum of vegetative form was prepared by an overnight culture of the *C. difficile* strain in Brain Heart Infusion (BHI) and diluted in sterile physiological serum to obtain the required concentration to ensure reproducible colonization (10^5 UFC/mL).

48 mice were sacrificed by groups (8 at a time) at days -6, 2, 7, 14, 21 and 28 after the orogastric challenge. Intracardiac blood collection was performed at each point (Figure 1). The group G was composed of 15 mice which were re-infected at D28 by the 630 Δ erm. The group H was composed of 15 mice which were re-infected at D28 by a non-toxicogenic strain ATCC43602 [25]. Intracardiac blood collection was performed at D56 as well as caecal content collection. Animals were monitored for clinical signs of CDI and weight loss.

2. Microbiota analysis

Stool samples of 4 mice were collected before antibiotic treatment (D-6), after 3 days of the antibiotic cocktail (D-3), just before the clindamycin administration (D-1) and the day of challenge (D0) (Figure1). Samples were weighted and stored at 80°C in 0.2 ml sterile tubes until the genomic DNA extraction step.

Total DNA was extracted from around 125 mg of frozen caecal contents using a bead-beating method with glass beads of 0.1 mm and a Bead Beater (Biospec Products Inc.,

Bartlesville, OK). Dry pellets were finally suspended in 100 µl of sterile water and stored at -20°C.

Bacterial V3-V4 region of the 16S ribosomal gene was amplified from the purified genomic DNA using the AmpliTaq Gold 360 and the primers F343-2 and R784-2 (sequence in Appendix A). Sequencing was performed using Illumina MiSeq technology on the technical platform GeT-PlaGe (Toulouse). Sequences were then analyzed and normalized with the pipeline FROGS (Find Rapidly Operational Taxonomic Unit (OTU) with Galaxy Solution). PCR primers were removed and sequences with sequencing error in the primers were excluded. Reads were clustered into OTUs using the Swarm clustering method. Chimera were removed and OTUs were assigned at different taxonomic levels (from phylum to species) using RDP classifier and NCBI Blast+ on Silva_123_16S database. reads were randomly selected for each sample to normalize data.

3. *C. difficile* detection in mouse fecal samples

To assess the colonization rate, fecal pellets were collected before antibiotic administration (D-6) and at D2, 7, 14, 21 and 28 after orogastric challenge. Colonization was also evaluated on caecal contents of sacrificed mice.

Ten mg of feces/caecal content were suspended in one mL of liquid casein yeast extract (LCY) broth, and 100 µL of ten-fold serial dilutions were cultured on Columbia agar containing 5% of horse blood, 25% (w/v) of D-cycloserine, and 0.8% (w/v) of cefoxitin. Typical fluorescent colonies were counted under UV light (312 nm). By using this method, the threshold of *C. difficile* detection in animal feces was 10 CFU/mg. At day 7 and 14 after challenge, fecal pellets were also incubated overnight in 5 mL of brain heart infusion broth (BHI) with 0.1% taurocholate then subcultured on Columbia agar plate. The results are expressed in a semi-quantitative form. Detection of free-toxins was performed at D2 on feces and caecal content (Techlab, C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE ®).

4. Antigens preparation

a. Toxins

As previously described, TcdA, TcdB were native toxins, produced from *C. difficile* strain R20291 and purified by double chromatography (gel filtration and ion exchange) [26].

b. Non-toxin antigens

As previously described, SlpA, FliC were recombinant proteins issued from the 630Δerm strain, produced from *E. coli* and purified by a single-step affinity chromatography (BD Talon cobalt affinity resin, BD Biosciences) [17,18].

5. Detection of specific antibodies by ELISA

Systemic anti-toxins and anti-SlpA, FliC IgG and IgM level were measured by ELISA as already described [17]. Mucosal IgA antibody level were determined on caecal samples. Briefly, coating was performed using carbonate/bicarbonate buffer (ph 9.5), toxin concentration was 1µg/mL and nontoxin antigens was 5 µg/mL. 1/20 dilution of sera was used to determine IgG level and 1/10 for IgM. Caecal contents were not diluted for IgA detection. Revelation was performed using streptavidin-biotin combination. Immunoglobulin levels were expressed in O.D. (405nm) units.

Serum IgM and IgG against TcdA, TcdB, SlpA and FliC were tested at D-6, D2, D7, D14, D21 and 28. IgA against TcdA, TcdB, SlpA and FliC were tested on caecal content at D56.

RESULTS

1. Clinical monitoring

Animals were symptomatic following the orogastric challenge (diarrhea, decreased activity and weight loss). We observed a global mortality of 15.9% that occurred between D2 and D7. The maximal mean weight loss was 15% observed at D2 which concurred with the clinical signs of CDI (Figure 2).

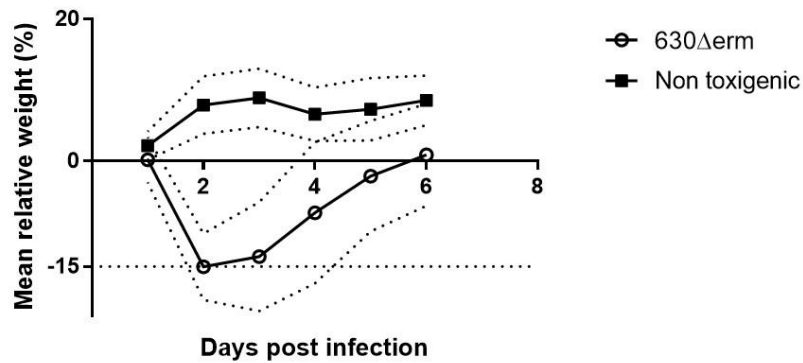


Figure 2: Mean relative weight loss after orogastric challenge by 10^5 spores of *C. difficile*

2. Microbiota analysis

Mice were treated for three days with antibiotics cocktail in drinking water from day 6 to day 3 prior to challenge. One day prior to challenge, mice received clindamycin intraperitoneally to induce disruption of gut microbiota and allow colonization by *C. difficile*. We wanted to validate the dysbiosis and compare the antibiotics cocktail and clindamycin effect on the microbiota population. We compared the gut microbiota population in fecal samples at day D-7 prior to any antibiotics treatment to D-3 after antibiotics cocktail administration to D-1 prior to clindamycin dose and to D0 prior to challenge. The predominant phylum observed in the initial microbiota are Bacteroidota, Firmicutes, Verrucomicrobiota, Proteobacteria and Actinobacteria. We observed an increase in the relative abundance of Proteobacteria and a decrease of Bacteroidota and Firmicutes following the antibiotics cocktail treatment from D-6 to D-3 prior to challenge. The administration of clindamycin intraperitoneally on D-1 prior to challenge induce an important increase of Proteobacteria compared to the antibiotics cocktail administration in drinking water (Figure 3).

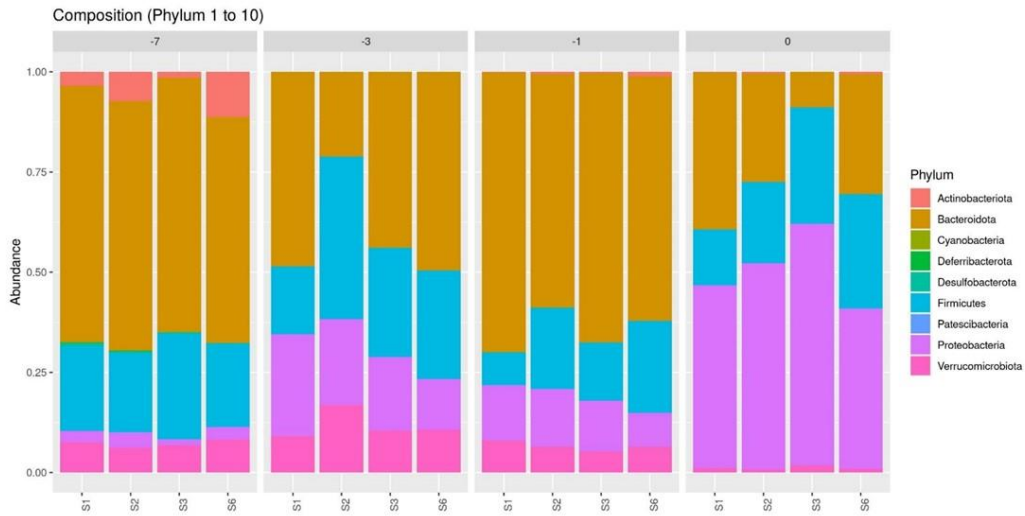


Figure 3 : Microbiota analysis at different time around infection par *Clostridioides difficile*

3. *C. difficile* colonization

None of animals were colonized at D-6. Mice were all colonized with *C. difficile* at D7 (22/22). At D14, 10 animals were colonized with *C. difficile* (58.8%) including 6 with direct detection on agar-based cultures (35.3%) and 4 for which *C. difficile* was detected after enrichment (23.5%). At D21, only 1 mouse was still colonized with *C. difficile* (after enrichment; 9%). Finally, no animals were colonized at D28 (Figure 4). Free-toxins were detected in 100% of the animals at D2.

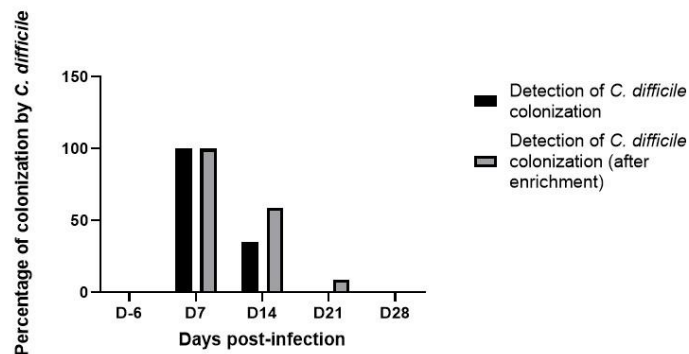


Figure 4: Colonization rate of infected mice after orogastric challenge by 10^5 spores of *C. difficile* for mice of groups A to F (n=48)

4. Humoral immune response

a. IgM response

The IgM response was quite heterogeneous among the different groups (Figure 5). However, we observed an appearance of IgM directed against all the antigens tested as early as the second day after infection and a significant increase in their level until D21 compared to the basal level in the D-6 group.

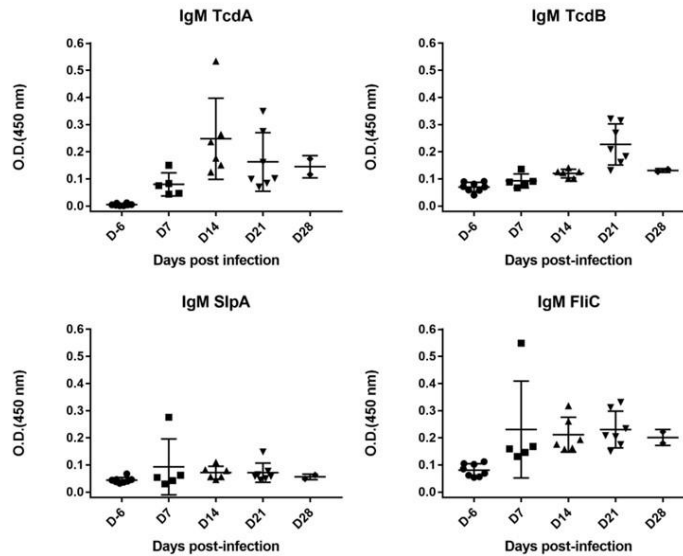


Figure 5: Kinetics of IgM appearance against TcdA, TcdB, SlpA and FliC after a primary CDI in C57Bl/6 mice

b. IgG response

The IgG response was also heterogeneous among the different groups (Figure 6). We have observed a later appearance of IgG directed against the toxins from D21 after infection. This increase was significant for anti-TcdA IgG at D21 and D28 ($p= 0.0022$ and $p= 0.0242$) and for anti-TcdB IgG at D21 and D28 ($p= 0.0051$ and $p= 0.0182$) compared to the basal level detected in the D-6 group. We did not detect anti-TcdA or anti-TcdB IgG for animals challenged by the non-toxigenic strain.

In contrast to anti-toxins IgG, no difference was observed for IgG against SlpA and FliC for all animals at any time after infection.

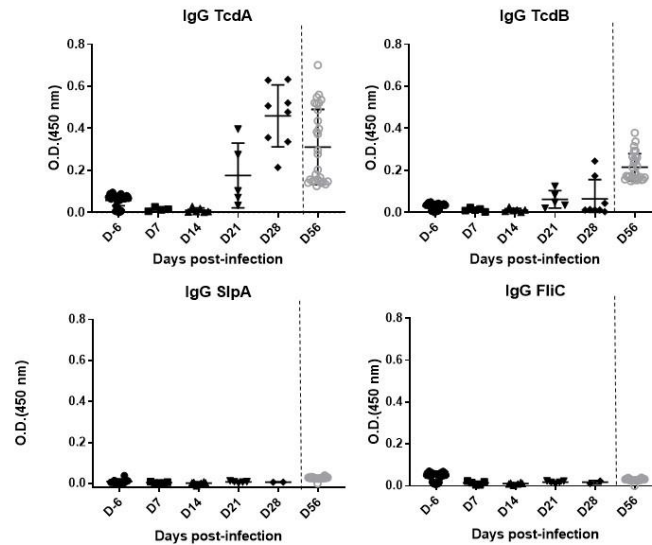


Figure 6: Kinetics of IgG appearance against TcdA, TcdB, SlpA and FliC after a primary CDI in C57Bl/6 mice

5. Mucosal immune response

A heterogeneous anti-TcdA and anti-TcdB IgA mucosal response was observed at D56 for all animals in the group infected with the toxigenic 630 Δ Erm strain (Figure 7). The levels of IgA levels were lower than the anti-TcdA IgA levels as we had observed for serum anti-toxins IgG. For animals challenged by the non-toxigenic strain, we did not observe neither anti-TcdA and anti-TcdB nor anti-SlpA and anti-FliC IgA. Regarding the surface protein response, no difference between the levels observed at D-6 and D56 of the two groups was observed for anti-SlpA and anti-FliC IgA. The animals did not have a mucosal response directed against SlpA and FliC as for the serum IgG response.

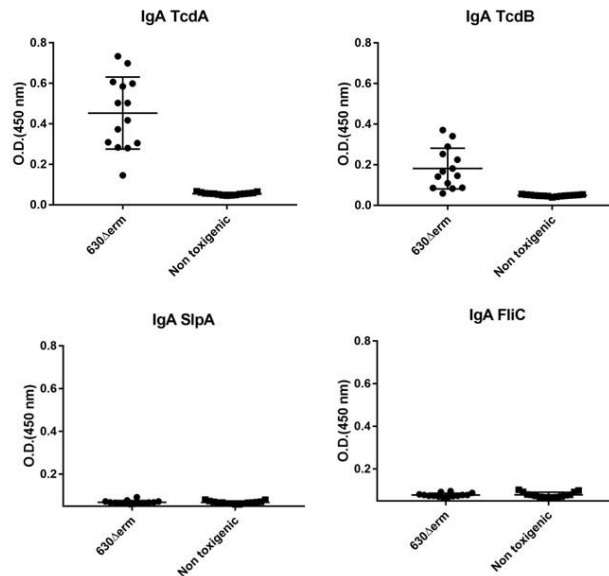


Figure 7 : Level of IgA against TcdA, TcdB, SlpA and FliC at D56 in animals from group G (630 Δ erm) and group H (Non toxicogenic)

DISCUSSION

The main objective of this work was to characterize the natural systemic and mucosal humoral immune responses to a primary CDI in a model reflecting the pathophysiology of CDI in humans.

Regarding animal models of CDI, the golden Syrian hamster or *Mesocricetus auratus* is preferably used as a lethal model of CDI and therefore, not reflecting the CDI evolution in humans [22]. Mice models have long been considered as colonization models but Chen *et al.* have showed that one model (based on C57Bl/6 mice) can be used as an infection model by varying strains and quantity of infecting *C. difficile* spores [23]. The infection course could reflect the human disease but the mortality rate was nevertheless high when mice were not treated by vancomycin for the CDI.

We used the Chen's model and modified the strain by the less virulent 630 Δ erm. We observed a clinical response to infection associated with spontaneous recovery within a few days, possibly reflecting the course of CDI in humans. In our trial, the mean mortality rate was 15.9%. Batah *et al.* observed 50% mortality using the same infection protocol but with the epidemic strain R20291 ribotype 027 [24]. These data show that the variability of infection in this model depends on the strain used. The mean weight loss of surviving mice between the two groups was 15% from basal levels with a nadir at D2. Their weight had returned to normal by day 6 post-infection. The mice were colonized by *C. difficile* until D14, but the colonization rates decreased from D7 and

disappeared between D14 and D21 for almost all animals. Thus, the mice were indeed infected and recovered from the infection without antibiotic treatment. These data agree with those of Chen *et al.* regarding the symptomatology of this model, but in their evaluation, they did not observe any death. However, the authors do not mention euthanasia and do not describe end points [23].

We were able to assess the primary adaptive immune response directed against toxins and major colonizing factors of *C. difficile* in the different groups of mice collected with end point samples.

We observed an early IgM response directed against toxins but also against SlpA and FliC as early as the seven day after infection. This response was heterogeneous in the groups but increased until D21 for all antigens tested.

Thereafter, we observed an elevation of anti-TcdA and anti-TcdB IgG as early as D21 after infection. However, we did not observe any IgG response directed against SlpA or FliC. One explanation could be an absence of class switching.

These results are consistent with those of Johnston *et al* [27]. Indeed, using the same model of infection in C57BL/6 mice and reinfected the surviving mice 5 weeks after recovery, they found in the serum of the mice before reinfection the presence of IgG directed against TcdA and TcdB but an absence of antibodies directed against the surface antigens of *C. difficile* (immunofluorescence and Western blot techniques).

The response directed against SlpA and FliC in mice could correspond to an adaptive immune response of the thymo-independent type, characterized by an early appearance of IgM (as early as D7), a low rate of class switching and thus a low rate of IgG secreted during the primary response. The thymo-independent response involves BCR and TLR receptors located on the surface of B cells (example of LPS with TLR-4), particularly those in the marginal zone [28,29]. The interaction of SlpA and FliC with TLR-4 and TLR-5 respectively supports these hypothesis [30,31]. The response directed against TcdA and TcdB is thought to be a thymo-dependent immune response because infection of Major Histocompatibility Complex type II KO mice results in 100% death in this model [27].

Regarding the reinfection at D28, the anti-TcdA and anti-TcdB IgG response was observed at D56 with a significant increase compared to the level observed at D-6. This response was also heterogeneous within the group. The observed anti-TcdB IgG levels were lower than the anti-TcdA IgG levels. No difference in the two groups

between the levels observed at D-6 and D56 was observed for anti-SlpA and anti-FliC IgG.

A heterogeneous mucosal anti-TcdA and anti-TcdB IgA response was observed at D56 for all animals in the group infected with toxigenic 630 Δ erm strain. The anti-TcdB IgA levels were lower than the anti-TcdA IgA levels as what we observed for serum anti-toxin IgG.

Regarding the surface protein response, no difference between the levels observed at D-6 and D56 of the two groups was observed for anti-SlpA and anti-FliC IgA. The animals did not have a mucosal response directed against SlpA and FliC as for the serum IgG response.

Despite reinfection 4 weeks after the first challenge, mice infected twice with the toxigenic strain did not respond with IgG directed against SlpA or FliC.

Infection and reinfection did not induce a mucosal immune response directed against SlpA or FliC. Indeed, the detection of caecal IgA at J69 only revealed IgA directed against TcdA and TcdB but not against SlpA or FliC.

Another explanation to the absence of IgG response against SlpA and FliC could be the availability of antigens for dendritic cells. Regarding toxins, many studies have shown that they are secreted into the intestinal lumen and can diffuse through the mucus to intestinal and immune cells. However, what about surface proteins outside the direct interactions between the bacteria and these cells? After treatment with antibiotics, SlpA and FliC could be unmasked after lysis of the bacteria, making them available and accessible to epithelial and immune cells. This contact would then lead to an adaptive immune response with presentation to T cells and generation of memory IgG antibodies. In perspective, we could repeat this trial by treating the mice after the infection with vancomycin to evaluate the impact of this treatment on the synthesis of serum IgG and mucosal IgA specifically directed against SlpA and FliC.

CONCLUSION

This model of primary CDI in naive C57Bl/6 mice led to a clinical response to infection, a persistent colonization and a mean mortality around 15%. We detected serum IgM and IgG as well as caecal IgA directed against *C. difficile* toxins A and B after infection and reinfection. Anti-TcdA and anti-TcdB IgM appear as early as day 7 after infection and isotype switching results in the appearance of serum IgG and caecal IgA directed against both toxins. This response appears to be protective when the host re-

encounters the bacteria 28 days after the first infection. The dysbiosis of C57Bl/6 microbiota induced by antibiotics used in Chen's model and leading to a CDI is mainly caused by an augmentation of *Proteobacteria* and diminution of *Actinobacteria*. In perspectives, this model could be used to evaluate the impact of different variables on the evolution of CDI such as differences in dysbiosis between inducing antibiotics, the infecting dose on the immune response and more.

Acknowledgement

We would like to thanks Professor Michel Popoff for his help to produce native toxins and Professor Marie-Lise Gougeon for her valuable advices.

References

- [1] S.C. Lim, D.R. Knight, T.V. Riley, Clostridium difficile and One Health, Clin Microbiol Infect. 26 (2020) 857–863. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>.
- [2] Y. Fu, Y. Luo, A.M. Grinspan, Epidemiology of community-acquired and recurrent Clostridioides difficile infection, Therap Adv Gastroenterol. 14 (2021) 17562848211016248. <https://doi.org/10.1177/17562848211016248>.
- [3] C. Liu, T. Monaghan, A. Yadegar, T. Louie, D. Kao, Insights into the Evolving Epidemiology of Clostridioides difficile Infection and Treatment: A Global Perspective, Antibiotics (Basel). 12 (2023) 1141. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071141>.
- [4] M.J.T. Crobach, J.J. Vernon, V.G. Loo, L.Y. Kong, S. Péchiné, M.H. Wilcox, E.J. Kuijper, Understanding Clostridium difficile Colonization, Clin. Microbiol. Rev. 31 (2018). <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-17>.
- [5] A. Mizrahi, A. Collignon, S. Péchiné, Passive and active immunization strategies against Clostridium difficile infections: state of the art, Anaerobe. 30 (2014) 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.07.006>.
- [6] W.K. Smits, D. Lyras, D.B. Lacy, M.H. Wilcox, E.J. Kuijper, Clostridium difficile infection, Nat Rev Dis Primers. 2 (2016) 16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>.
- [7] J. van Prehn, E. Reigadas, E.H. Vogelzang, E. Bouza, A. Hristea, B. Guery, M. Krutova, T. Norén, F. Allerberger, J.E. Coia, A. Goorhuis, T.M. van Rossen, R.E. Ooijevaar, K. Burns, B.R. Scharvik Olesen, S. Tschudin-Sutter, M.H. Wilcox, M.J.G.T. Vehreschild, F. Fitzpatrick, E.J. Kuijper, Guideline Committee of the European Study Group on Clostridioides difficile, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for Clostridioides difficile infection in adults, Clin Microbiol Infect. 27 Suppl 2 (2021) S1–S21. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>.
- [8] C.G. Buffie, V. Bucci, R.R. Stein, P.T. McKenney, L. Ling, A. Gobourne, D. No, H. Liu, M. Kinnebrew, A. Viale, E. Littmann, M.R.M. van den Brink, R.R. Jenq, Y. Taur, C. Sander, J.R. Cross, N.C. Toussaint, J.B. Xavier, E.G. Pamer, Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to Clostridium difficile, Nature. 517 (2015) 205–208. <https://doi.org/10.1038/nature13828>.

- [9] L. Kyne, M. Warny, A. Qamar, C.P. Kelly, Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A, *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 390–397. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002103420604>.
- [10] L. Kyne, M. Warny, A. Qamar, C.P. Kelly, Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea, *Lancet.* 357 (2001) 189–193. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03592-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03592-3).
- [11] M.E. Mulligan, S.D. Miller, L.V. McFarland, H.C. Fung, R.Y. Kwok, Elevated levels of serum immunoglobulins in asymptomatic carriers of *Clostridium difficile*, *Clin. Infect. Dis.* 16 Suppl 4 (1993) S239-244.
- [12] A. von Eichel-Streiber, W. Paik, K. Knight, K. Gisch, K. Nadjafi, C. Decker, O. Bosnjak, A. Cheknis, S. Johnson, C. von Eichel-Streiber, Induction of antitoxin responses in *Clostridium-difficile*-infected patients compared to healthy blood donors, *Anaerobe.* 41 (2016) 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.07.001>.
- [13] S. Johnson, D.N. Gerding, E.N. Janoff, Systemic and mucosal antibody responses to toxin A in patients infected with *Clostridium difficile*, *J. Infect. Dis.* 166 (1992) 1287–1294.
- [14] R. Viscidi, B.E. Laughon, R. Yolken, P. Bo-Linn, T. Moench, R.W. Ryder, J.G. Bartlett, Serum antibody response to toxins A and B of *Clostridium difficile*, *J. Infect. Dis.* 148 (1983) 93–100.
- [15] M. Wullt, T. Norén, A. Ljungh, T. Åkerlund, IgG antibody response to toxins A and B in patients with *Clostridium difficile* infection, *Clin Vaccine Immunol.* 19 (2012) 1552–1554. <https://doi.org/10.1128/CVI.00210-12>.
- [16] M. Warny, J.P. Vaerman, V. Avesani, M. Delmée, Human antibody response to *Clostridium difficile* toxin A in relation to clinical course of infection, *Infect. Immun.* 62 (1994) 384–389.
- [17] J.-F. Bruxelle, A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné, Immunogenic properties of the surface layer precursor of *Clostridium difficile* and vaccination assays in animal models, *Anaerobe.* 37 (2016) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.010>.
- [18] J.-F. Bruxelle, A. Mizrahi, S. Hoys, A. Collignon, C. Janoir, S. Péchiné, *Clostridium difficile* flagellin FliC: Evaluation as adjuvant and use in a mucosal vaccine against *Clostridium difficile*, *PLoS ONE.* 12 (2017) e0187212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187212>.

- [19] A. Mizrahi, J.-F. Bruxelles, S. Péchiné, A. Le Monnier, Prospective evaluation of the adaptive immune response to SlpA in *Clostridium difficile* infection, *Anaerobe*. 54 (2018) 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.09.008>.
- [20] L.K. Kociolek, R.O. Espinosa, D.N. Gerding, A.R. Hauser, E.A. Ozer, M. Budz, A. Balaji, X. Chen, R.R. Tanz, N. Yalcinkaya, M.E. Conner, T. Savidge, C.P. Kelly, Natural *Clostridioides difficile* Toxin Immunization in Colonized Infants, *Clin. Infect. Dis.* 70 (2020) 2095–2102. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz582>.
- [21] M.L. Hutton, K.E. Mackin, A. Chakravorty, D. Lyras, Small animal models for the study of *Clostridium difficile* disease pathogenesis, *FEMS Microbiol Lett.* 352 (2014) 140–149. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12367>.
- [22] C. Burdet, S. Sayah-Jeanne, T.T. Nguyen, P. Hugon, F. Sablier-Gallis, N. Saint-Lu, T. Corbel, S. Ferreira, M. Pulse, W. Weiss, A. Andremont, F. Mentré, J. de Gunzburg, Antibiotic-Induced Dysbiosis Predicts Mortality in an Animal Model of *Clostridium difficile* Infection, *Antimicrob Agents Chemother.* 62 (2018). <https://doi.org/10.1128/AAC.00925-18>.
- [23] X. Chen, K. Katchar, J.D. Goldsmith, N. Nanthakumar, A. Cheknis, D.N. Gerding, C.P. Kelly, A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease, *Gastroenterology*. 135 (2008) 1984–1992. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>.
- [24] J. Batah, H. Kobeissy, P.T. Bui Pham, C. Denève-Larrazet, S. Kuehne, A. Collignon, C. Janoir-Jouveshomme, J.-C. Marvaud, I. Kansau, *Clostridium difficile* flagella induce a pro-inflammatory response in intestinal epithelium of mice in cooperation with toxins, *Sci Rep.* 7 (2017) 3256. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03621-z>.
- [25] M. Delmée, Y. Laroche, V. Avesani, G. Cornelis, Comparison of serogrouping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiol.* 24 (1986) 991–994.
- [26] S.-W. Fu, J. Xue, Y.-L. Zhang, D.-Y. Zhou, Simplified purification method for *Clostridium difficile* toxin A, *World J Gastroenterol.* 10 (2004) 2756–2758. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i18.2756>.
- [27] P.F. Johnston, D.N. Gerding, K.L. Knight, Protection from *Clostridium difficile* infection in CD4 T Cell- and polymeric immunoglobulin receptor-deficient mice, *Infect. Immun.* 82 (2014) 522–531. <https://doi.org/10.1128/IAI.01273-13>.

- [28] Z. Hua, B. Hou, TLR signaling in B-cell development and activation, *Cell. Mol. Immunol.* 10 (2013) 103–106. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.61>.
- [29] C. Pasare, R. Medzhitov, Control of B-cell responses by Toll-like receptors, *Nature.* 438 (2005) 364–368. <https://doi.org/10.1038/nature04267>.
- [30] A. Ryan, M. Lynch, S.M. Smith, S. Amu, H.J. Nel, C.E. McCoy, J.K. Dowling, E. Draper, V. O'Reilly, C. McCarthy, J. O'Brien, D. Ní Eidhin, M.J. O'Connell, B. Keogh, C.O. Morton, T.R. Rogers, P.G. Fallon, L.A. O'Neill, D. Kelleher, C.E. Loscher, A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins, *PLoS Pathog.* 7 (2011) e1002076. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002076>.
- [31] I. Jarchum, M. Liu, L. Lipuma, E.G. Pamer, Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis, *Infect. Immun.* 79 (2011) 1498–1503. <https://doi.org/10.1128/IAI.01196-10>.

Annexe 2 : Purification des protéines de surface SlpA et FliC.

Tableau : liste des souches et plasmides utilisés

	Nom	Caractéristiques	Origine
Souche	TGI	<i>E. coli</i> K12 (F', <i>tra</i> D36, <i>laclq</i> , Δ <i>lacZ</i> , MIS, pro A ⁺ B ⁺ /SupE, Δ (<i>hdsM-mcrB</i>)	
	BL21	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) [malB]</i> K ₋₁₂ (λ ^S)	
Plasmide	pSP2	Plasmide qui porte la construction <i>slpA-histag</i>	Stock du laboratoire
	pET28	Plasmide qui porte la construction <i>fliC-histag</i>	Stock du laboratoire

Le précurseur de la couche S (SlpA)

Une souche recombinante d'*E. coli* TGI possédant le plasmide pSP2 exprimant une séquence codant pour l'His-tag à l'extrémité 3' du gène *slpA* issue de la souche 630 de *C. difficile* a été utilisée pour la purification de la protéine recombinante SlpA.

Une pré-culture de la souche d'*E. coli* pSP2 a été mise en culture dans 2L du milieu Luria Bertani (LB) additionnée de 2 mL d'Ampicilline à une concentration de 100mg/mL pour le maintien du plasmide. L'IPTG (IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside) à 1 mM a été ajouté à la culture pendant 4h pour induire la production de la protéine. Après une centrifugation à 8000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, les culots sont récupérés et congelés à -20°C jusqu'au jour de l'extraction.

Le culot est ensuite repris par 40 mL de tampon de lyse dénaturant contenant 0,1M NaH₂PO₄, 8M Urée, 0,01M Tris HCl à pH 8. Une sonication du mélange obtenu est réalisé jusqu'à l'obtention d'un aspect limpide. Ensuite, une centrifugation à 9500 rpm, pendant 30 minutes à 20°C afin de récupérer le surnageant contenant les protéines.

La purification a été réalisée sur une colonne de chromatographie avec une résine de billes de Nickel utilisé selon les instructions du fournisseur. Brièvement, 1 mL de billes de nickel (correspond à 500 μ L de la matrice) est déposé au fond de la colonne chromatographique. Un lavage par du tampon de lyse est réalisé afin d'équilibrer les billes et permettre la rétention des protéines sur les billes.

Ensuite, on fait passer progressivement les 40 mL de surnageant protéique sur la colonne. Une fois les surnageant passés, un lavage avec 10 mL de tampon de lyse est réalisé. Enfin, une élution est réalisée avec 1 mL du tampon de lyse additionné d'imidazole en gradient de concentrations (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM et 1 M).

Un dessalage est réalisé sur les fractions obtenues contenant la protéine sans impuretés sur une colonne PD10 selon le protocole du fournisseur afin d'éliminer l'imidazole. L'éluât est conservé à -20°C.

Les fractions contenant les protéines sont analysées sur gel polyacrylamide (stacking gel 6% et separating gel 12%). La migration est réalisée pendant 1 h à 200 V. Après la migration, le gel est coloré directement au bleu de Coomassie pendant 1 heure.

La flagelline (FliC)

Une souche recombinante d'*E. coli* BL21 possédant le plasmide pET-28 exprimant une séquence codant pour l'His-tag à l'extrémité 3' du gène *fliC* issue de la souche 630 de *C. difficile* a été utilisée pour la purification de la protéine recombinante FliC. La purification de FliC a été réalisée selon le même protocole que pour la production et purification de SlpA décrit ci-dessous mais avec 40 mg/ml de kanamycine pour le maintien du plasmide.

Résultats de la purification de SlpA et FliC

Le dessalage sur colonne PD10 a été réalisé avec les fractions éluées à 40, 60 et 80mM d'imidazole pour la protéine FliC et 60mM et 80 mM pour la protéine SlpA.

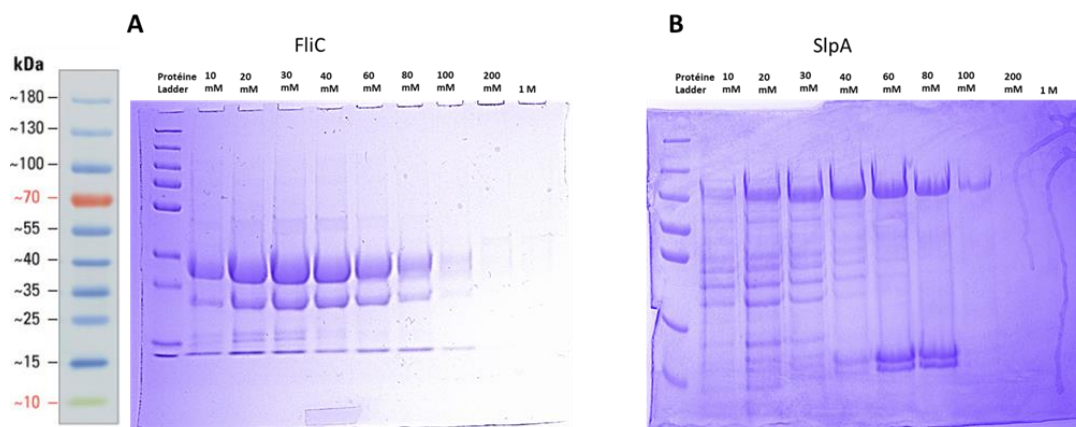


Figure 1 : Gels polyacrylamides des fractions contenant la protéine FliC (A) et la protéine SlpA (B) purifiées en conditions dénaturantes (avant dessalage sur la colonne PD10).

Nous avons réalisé plusieurs batch de purification pour chaque protéine et les fractions ont été regroupées afin d'obtenir un unique lot de protéines pour la quantification des anticorps dirigés contre les protéines de surface SlpA ou FliC.

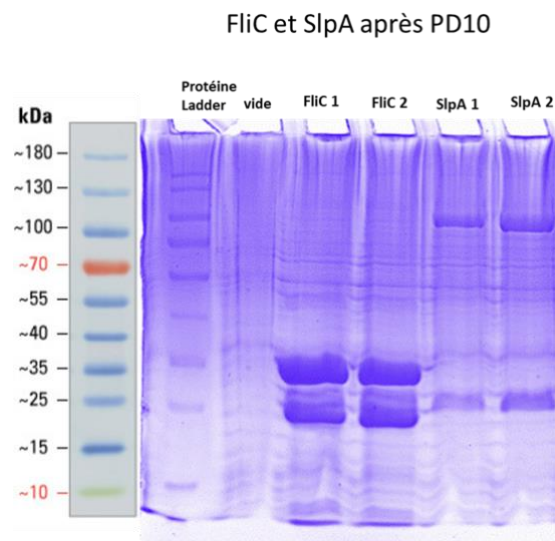


Figure 2 : Gel polyacrylamide des protéines FliC et SlpA après dessalage sur colonne PD10.

Un dosage par la méthode Bradford « *Biorad Protein Assay* » est réalisé afin de déterminer la concentration des protéines. Une gamme étalon a été préparé à partir de concentrations connues d'albumine de sérum bovine (BSA) suivi de la lecture de la D.O à 595 nm par un spectrophotomètre. Dans l'ensemble, nous avons obtenu une concentration de 1,1 mg/mL pour FliC et 0,35 mg/mL pour SlpA.

Annexe 3 : Protocole d'ELISPOT

Matériels :

- Milieu de culture complet RPMI 10% SVF 5% pénicilline/streptomycine
- PBS stérile
- PBS + 0,05% Tween20
- PBS + 0,05% Tween20 + SVF 1%
- RPMI + 1% de BSA
- Plaques ELISPOT Millipore MSIPS4W10

Protocole :

J-1 : coating des plaques

- Pré-wet : incuber les plaques avec 15 μ L /puits d'éthanol 35% pendant 1 minute à RT.
- Rincer 2 fois avec 300 μ L PBS stérile (=tampon de coating)
- Coater les plaques avec 100 μ L de PBS contenant l'antigène (30 μ g/mL) ou 10 μ g/mL de goat anti-mouse Ig (Bethyl ELISA 1/100)
- Incuber à 4°C over-night

J0 : Spotting

- Laver 1 fois avec 300 μ L PBS stérile
- Laver 2 fois avec 300 μ L PBS-Tween
- Bloquer avec 200 μ L de RPMI-BSA 1%, 2 à 4h à 37°C
- Enlever la solution de blocage
- Laver avec 300 μ L de PBS stérile
- Ajouter les cellules dans 100 μ L de milieu complet
- Incuber à 37°C pendant 5-6h (ou O/N)
- Laver 3x en PBS puis 3x en PBS-Tween
- Ajouter 100 μ L d'anti-mouse IgG-HRP (1:10000; Bethyl)
- Incuber à RT 1h dans le noir
- Laver 3 fois en PBS + 0,05% Tween20
- Laver 3 fois dans du PBS
- Incuber 100 μ L de TMB pour ELISPOT ou AEC pendant 10 minutes (selon la couleur du fond)

- Laver avec de l'eau abondamment. Retirer l'opercule de plastique recouvrant le fond des puits. Laver à l'eau le fond des puits.
- Sécher sur du papier.
- Emballer dans du papier et de l'alu. Sécher minimum 24h avant lecture.

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir de selles avec le kit Qiagen® (QIAamp Fast DNA Stool ; ref 51604)

Extraction

- 1) Transférer l'équivalent 180-200mg de selles (ou 200µL si fèces liquides) dans un tube de 2 mL
- 2) Rajouter rapidement **1 mL d'Inhibitex**. Vortexer vigoureusement durant 1min

PS 1 : si la selle est dans un tube de 1,5 mL ajouter dans un premier temps 500 µl d'inhibiTex pour la récupérer et la transférer dans un tube de 2 mL puis 500 µl supplémentaire pour rincer le tube de 1,5 mL.

PS 2 : si l'échantillon de selles est de **plus de 250 mg**, séparer le mélange après avoir ajouté l'inhibitex dans 2 tubes de 2 mL et ajouter 500 µl d'inhibitex supplémentaire sur chacun des aliquotes. Regrouper les surnageant des aliquotes dans un unique tube de 2 mL après les étapes 3 et 4.

- 3) Incuber au bain-marie à 95°C pendant 15 min
- 4) Centrifuger à vitesse max pendant 1 min et transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- 5) Pipeter **15 µL de protéinase K** dans un tube de 1,5 mL.
- 6) Ajouter **200 µL du surnageant** dans le tube 1,5 mL contenant la protéinase K
- 7) Rajouter **200µL de tampon AL** et vortexer 15 sec
- 8) Incuber au bain marie à 70°C pendant 10 min
- 9) Incuber à température ambiante pendant 10 min
- 10) Centrifuger à vitesse max pendant 3 min et transférer le surnageant contenant le lysat des cellules végétatives dans un nouveau tube et y ajouter **200 µL d'éthanol absolu**. Incuber à température ambiante pendant 10 min

PS : ne jamais ajouter l'éthanol dans le tube avant d'ajouter le surnageant.

- 11) Reprendre le culot contenant les spores dans **250 µL d'Inhibitex et 250 µL de tampon AL**. Placer le mélange dans un tube à vis contenant **565 mg de billes en verre** de diamètre 0,1mm (jusqu'au trait du petit tube calibrage)
- 12) Faire deux passages de 2x30s au Fast-Prep puissance 6,5 (soit 6 min au total). Placer les tubes dans la glace entre les deux passages

13) Après une courte centrifugation (3 sec à 5000 rpm), transférer le surnageant contenant le lysat des spores dans un tube de 2 mL

14) Ajouter **250 µL d'éthanol absolu** et mélanger en vortexant

PS : dans le cas des spores, il est possible de préremplir les tubes avec l'éthanol avant d'ajouter le surnageant contenant le lysat des spores. Il faut cependant éviter de mettre le cône dans l'éthanol et le remettre dans le tube contenant le lysat des spores lors du prélèvement du surnageant.

15) Au choix :

- a. Extraction ADN total: rassembler les deux lysats et les faire passer dans une colonne purification (deux centrifugations successives à vitesse max pendant 1 min)
- b. Extraction différentielle de l'ADN des cellules végétatives et des spores : mettre le lysat des cellules végétatives dans une colonne et le lysat des spores dans une autre

16) Centrifuger à vitesse max pendant 1 min et transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur

17) Ajouter **500 µL de tampon AW1** et centrifuger à vitesse max pendant 1 min. Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur

18) Ajouter **500 µL de tampon AW2** et centrifuger à vitesse max pendant 3 min. Transférer la colonne dans un tube de 2 mL dont le capuchon aura été coupé

19) Centrifuger à vide à vitesse max pendant 3 min.

20) Transférer la colonne dans un tube de 1,5 mL et ajouter soigneusement **50 µL de tampon ATE** sur la résine. Laisser à température ambiante sur un portoir pendant 1 min.

PS : il est recommandé de faire l'élution en 2 fois avec 30 µL + 20 µL ATE

21) Centrifuger à vitesse max pendant 1 min pour éluer l'ADN.

Annexe 5 : Liste des échantillons séquencés pour l'analyse de la modulation du microbiote intestinal

Jour	Groupe	Sample ID	Numéro échantillon	Souris	Poids (mg)	Concentration (ng/ml)
J-6	Témoin	F13607	1	A1	45,1	38
		F13608	3	A3	52,1	50
		F13609	5	A5	89,1	50
		F13610	6	A6	73,8	50
	VAN	F13611	9	B1	94,7	50
		F13612	10	B2	131,4	50
		F13613	12	B4	60,8	50
		F13614	13	B5	52,9	50
	MTZ	F13615	17	C1	35	50
		F13616	18	C2	91	50
		F13617	19	C3	75,1	50
		F13618	20	C4	56	50
	FDX	F13619	25	D1	92,9	50
		F13620	26	D2	88,2	50
		F13621	27	D3	69,3	50
		F13622	29	D5	103	50
	R	F13623	51	G3	78,5	50
		F13624	52	G4	66	50
		F13625	54	G6	76,9	50
	J0	Témoin	F13626	57	A1	128,9
F13627			59	A3	170,6	50
F13628			61	A5	86,8	50
F13629			62	A6	47,2	33
VAN		F13630	65	B1	106,9	36
		F13631	66	B2	81,8	42
		F13632	68	B4	60	50
		F13633	69	B5	86,1	28
MTZ		F13634	73	C1	40,2	50
		F13635	74	C2	111,6	50

		F13636	75	C3	85,1	50
		F13637	76	C4	91,8	50
		F13638	81	D1	91,3	50
	FDX	F13639	82	D2	63,8	50
		F13640	83	D3	47,8	50
		F13641	85	D5	68,5	50
	R	F13642	107	G3	132	50
		F13643	108	G4	115,1	50
		F13644	110	G6	137	50
J2	Témoïn	F13645	113	A1	14	25
		F13646	115	A3	111,8	50
		F13647	116	A5	174,8	50
		F13648	117	A6	131,2	50
	VAN	F13649	119	B1	50,3	22
		F13650	120	B2	61,2	36
		F13651	122	B4	117,1	50
		F13652	123	B5	40	36
	MTZ	F13653	127	C1	257,3	50
		F13654	128	C2	85	50
		F13655	129	C3	137,7	50
		F13656	130	C4	108,8	50
	FDX	F13657	133	D1	120,4	50
		F13658	134	D2	52,4	50
		F13659	135	D3	66,3	50
		F13660	136	D5	50,9	50
	R	F13661	152	G3	254,9	50
		F13662	153	G4	54,3	34
		F13663	155	G6	136,4	50
	J5	Témoïn	F13664	156	A1	103
F13665			158	A3	109,6	50
F13666			160	A5	104,5	50
F13667			161	A6	164,8	50
VAN		F13668	164	B1	58,3	41

		F13669	165	B2	225,9	50	
		F13670	167	B4	150	50	
		F13671	168	B5	328	50	
	MTZ	F13672	172	C1	201	50	
		F13673	173	C2	298,4	50	
		F13674	174	C3	185,35	50	
		F13675	175	C4	191,05	50	
	FDX	F13676	180	D1	193,5	50	
		F13677	181	D2	149,3	50	
		F13678	182	D3	122,5	50	
		F13679	184	D5	87,3	50	
	J7	Témoïn	F13680	212	A1	92,2	50
			F13681	214	A3	89,5	50
F13682			216	A5	111,6	50	
F13683			218	A6	197,5	50	
VAN		F13684	220	B1	225,9	50	
		F13685	221	B2	243,9	50	
		F13686	223	B4	277,4	50	
		F13687	224	B5	165,5	50	
MTZ		F13688	228	C1	135,4	50	
		F13689	229	C2	237,1	50	
		F13690	230	C3	158,3	50	
		F13691	231	C4	115,1	50	
FDX		F13692	236	D1	101,6	50	
		F13693	237	D2	250,2	50	
		F13694	238	D3	295,6	50	
		F13695	240	D5	73,1	50	
J14	Témoïn	F13696	324	A1	120,2	50	
		F13697	326	A3	108,5	50	
		F13698	328	A5	122,5	50	
		F13699	329	A6	159,7	50	
	VAN	F13700	332	B1	117,5	50	
		F13701	333	B2	69,9	50	

		F13702	335	B4	88,7	50
		F13703	336	B5	79,5	50
	MTZ	F13704	340	C1	151,6	50
		F13705	341	C2	113,4	50
		F13706	342	C3	67,7	50
		F13707	343	C4	109,7	50
	FDX	F13708	348	D1	193,8	50
		F13709	349	D2	92,2	50
		F13710	350	D3	244,2	50
		F13711	352	D5	205,8	50
	R	F13712	374	G3	127,9	50
		F13713	375	G4	110,4	50
		F13714	377	G6	130,2	50
J18	R	F13715	433	G3	150,5	50
		F13716	434	G4	97	50
		F13717	435	G6	210,5	50
J28	Témoïn	F13718	438	A1	141,6	50
		F13719	440	A3	102,5	50
		F13720	442	A5	124,6	50
		F13721	443	A6	228,8	50
	VAN	F13722	446	B1	179,2	50
		F13723	447	B2	183,6	50
		F13724	449	B4	229,2	50
		F13725	450	B5	274,6	50
	MTZ	F13726	454	C1	144	50
		F13727	455	C2	179,7	50
		F13729	456	C3	78,7	50
		F13730	457	C4	85,2	50
	FDX	F13731	462	D1	227,4	50
		F13732	463	D2	159,2	50
		F13733	464	D3	166,6	50
F13734		466	D5	155,65	50	
R	F13735	480	G3	172,4	50	

		F13736	481	G4	167,8	50
		F13737	483	G6	124,2	50
J31	R	F13738	528	G3	135,6	50
		F13739	529	G4	130,7	50
		F13740	531	G6	210,7	50
J0 bis (J37)	Témoïn	F13741	542	A1	95,9	50
		F13742	544	A3	100,1	50
		F13743	546	A5	136,8	50
		F13744	547	A6	227	50
	VAN	F13745	550	B1	77,3	50
		F13746	551	B2	203,1	50
		F13747	553	B4	116,4	50
		F13748	554	B5	204,7	50
	MTZ	F13749	558	C1	228,3	50
		F13750	559	C2	192	50
		F13751	560	C3	440,8	50
		F13752	561	C4	308,6	50
	FDX	F13753	566	D1	102,4	50
		F13754	567	D2	260,7	50
		F13755	568	D3	134,8	50
		F13756	570	D5	197,3	50
	R	F13757	584	G3	116,1	50
		F13758	585	G4	111,4	50
		F13759	587	G6	186,1	50
	J2 bis (J39)	Témoïn	F13760	590	A1	210,2
F13761			592	A3	188,9	50
F13762			594	A5	164,9	50
F13763			595	A6	231,9	50
VAN		F13764	598	B1	113,1	50
		F13765	599	B2	272,6	50
		F13766	601	B4	182,9	50
		F13767	602	B5	193,2	50
MTZ		F13768	606	C1	190,6	50

		F13769	607	C2	159,1	50
		F13770	608	C3	406,7	50
		F13771	609	C4	164,9	50
	FDX	F13772	614	D1	424,3	50
		F13773	615	D2	310,7	50
		F13774	616	D3	151,7	50
		F13775	618	D5	335,2	50
	R	F13776	632	G3	213,7	50
		F13777	633	G4	140,3	50
F13778		635	G6	177,7	50	
J14 bis (J51)	Témoign	F13779	782	A1	258,5	50
		F13780	784	A3	222,2	50
		F13781	786	A5	321,7	50
		F13782	787	A6	363	50
	VAN	F13783	790	B1	106,2	50
		F13784	791	B2	216,7	50
		F13785	793	B4	279,4	50
		F13786	794	B5	190,1	50
	MTZ	F13787	798	C1	400,9	50
		F13788	799	C2	541,4	50
		F13789	800	C3	532,3	50
		F13790	801	C4	199	50
	FDX	F13791	806	D1	646,6	50
		F13792	807	D2	573,1	50
		F13793	808	D3	463,4	50
		F13794	810	D5	397,7	50
	R	F13795	824	G3	282	50
		F13796	825	G4	94,4	50
		F13797	827	G6	217,8	50

Annexe 6 : Posters et communications orales

A new method for the production of TcdA and TcdB toxins from *Clostridioides difficile*

Poster présenté lors des congrès suivants :

- SFM Microbes 2022 (03 – 05 octobre 2022 à Montpellier)
- ECCMID 2023 (*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 avril 2023, à Copenhague- Danemark)
- JED (Journée de l'école doctorale ; 29 juin 2023)
- ClosPath 2023 (19 – 23 septembre 2023, à Banff-Canada)

Communication orale

- Séminaire interne de l'institut Micalis (16 septembre 2023)
- RCDF 4^{ème} édition (Réseau *Clostridioides difficile* France, 01 juin 2023)

Impact of antibiotics on the digestive colonization by *Clostridioides difficile* and the adaptive immune response

Poster présenté lors des congrès suivants :

- SFM Microbes 2023 (04 – 06 octobre 2023 à Rennes)

Communication orale :

- RICAI (Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, 18 décembre 2023 à Paris)

A new method for the production of TcdA and TcdB toxins from *Clostridioides difficile*

Afi Akofa Diane Sapa¹, Anaïs Brosse¹, Héloïse Coullon¹, Gauthier Pean de Ponfilly^{1,2}, Thomas Candela¹, Alban Le Monnier^{1,2}

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France.

² Service de Microbiologie Clinique, GH Paris Saint-Joseph, Paris, France

Contact: afi-akofa-diane.sapa@universite-paris-saclay.fr

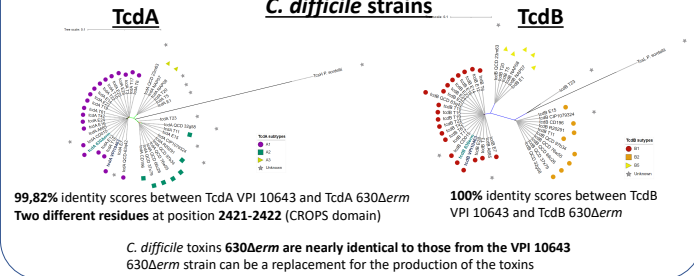


CONTEXT

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a major pathogen responsible for digestive healthcare-associated infections. Antibiotic treatments are the main risk factor for *C. difficile* infections (CDI) because they disrupt the gut microbiota. In this context of dysbiosis, the spores of *C. difficile* germinate into vegetative forms which then colonize the gut microbiota, multiply, and produce virulence factors, in particular enterotoxin A (TcdA) and cytotoxin B (TcdB). The action of these two toxins will cause an alteration of the cytoskeleton, neutrophils recruitment, thus promoting the inflammatory process and leading to the clinical manifestations of CDI. The study of toxins is therefore a crucial step in exploring the virulence of this pathogen. Currently, the purification process of native toxins is either laborious and time-consuming in *C. difficile* or performed in heterologous hosts. Thus, we propose a new method to obtain rapidly functional toxins directly from a *C. difficile* as the host.

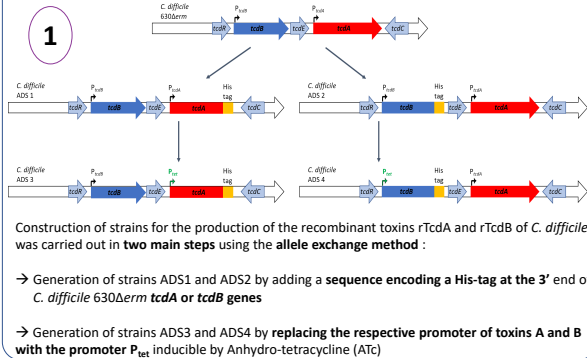
SELECTION OF *C. difficile* STRAIN

Protein sequence comparison for TcdA and TcdB across 39

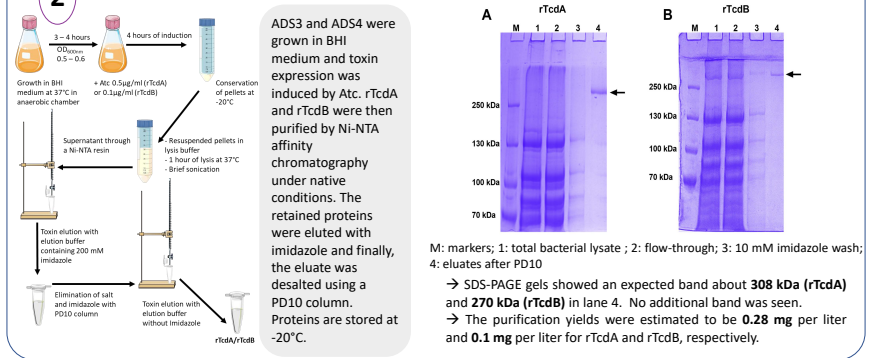


CONSTRUCTION, EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT TOXINS

Strains construction for the production of rTcdA and rTcdB

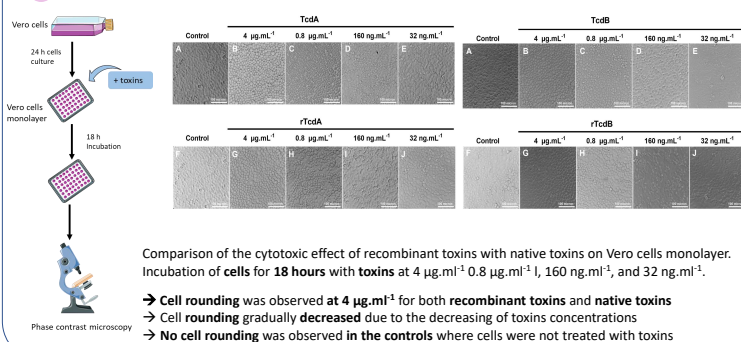


Expression and purification of rTcdA and rTcdB

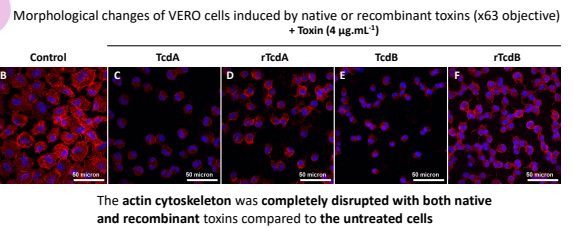


FUNCTIONAL ASSAYS

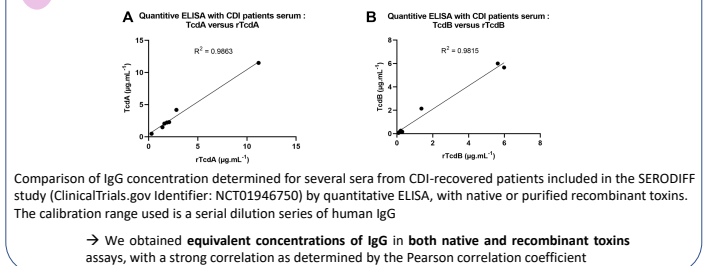
1 Purified recombinant toxins have similar cytotoxicity activity compared to native toxins



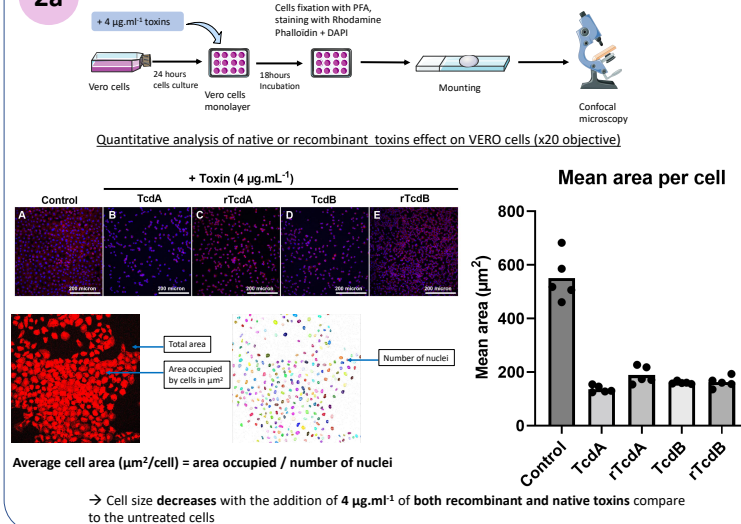
2b Purified recombinant toxins are as active as native toxins



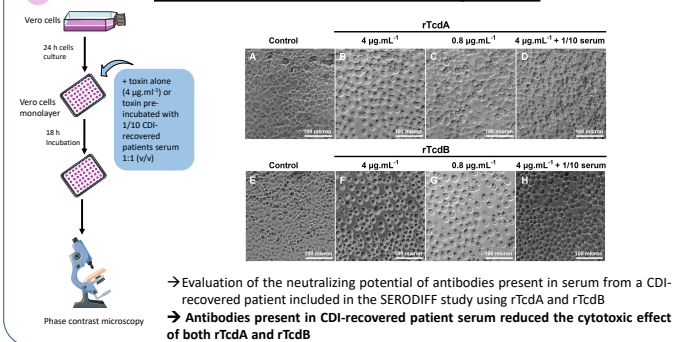
3 Purified recombinant toxins can be used as substitutes for native toxins in clinical CDI investigational studies



2a Purified recombinant toxins are as active as native toxins



4 Purified recombinant toxins can be neutralized by serum antibodies from CDI recovered patients



CONCLUSION

To successfully produce and purify rTcdA and rTcdB, we first generated two strains ADS1 and ADS2 by adding a sequence encoding a His-tag at the 3' end of *C. difficile* 630Δerm *tcdA* or *tcdB* genes and then replaced toxins promoter with the promoter P_{tet} inducible by ATc. We successfully developed a simple routine method that allows the production and purification of biologically rTcdA and rTcdB active toxins with similar activities compared to native toxins.

Impact of antibiotics on the dynamics of digestive colonization by *Clostridioides difficile* and on the adaptive immune response

Afi Akofa Diane Sapa¹, Anaïs Brosse¹, Sandra Höys¹, Aurélie Baliarda¹, Gauthier Pean de Ponfilly^{1,2}, Assaf Mizrahi^{1,2}, Alban Le Monnier^{1,2}

¹ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France

² Service de Microbiologie Clinique, GH Paris Saint-Joseph, Paris, France

Contact: afi-akofa-diane.sapa@universite-paris-saclay.fr

anaïs.brosse@universite-paris-saclay.fr

université
PARIS-SACLAY

AgroParisTech
Talents d'une planète soutenable

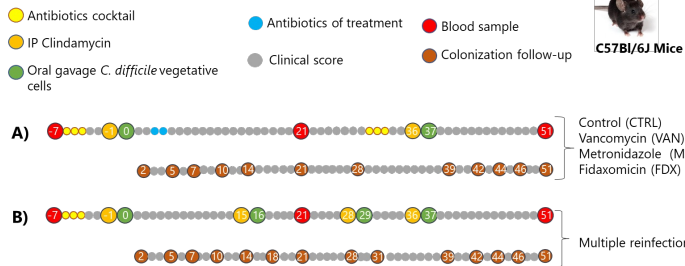
INRAE

Micalis

CONTEXT

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a Gram-positive, anaerobic, spore-forming described as a causative agent of digestive tract infections often involved in antibiotic-associated diarrhea. The major virulence factors of *C. difficile* are TcdA and TcdB toxins which are responsible for the clinical manifestation of *C. difficile* infections (CDI) ranging from simple diarrhea, spontaneously resolving on discontinuation of dysbiosis-inducing antibiotics, to severe forms. Currently, standard care for CDI involves the administration of fidaxomicin, vancomycin, and metronidazole (if the other two are not available). However, despite successful treatment of the initial CDI episode, recurrence occurs in 20-35 % of patients. The evolution of CDI appears to be correlated with the development of the host's adaptive immune response. Using a mouse model of colonization and infection by *C. difficile* (host naïve to any contact with *C. difficile*), we assessed the impact of vancomycin, fidaxomicin, and metronidazole on the dynamics of *C. difficile* digestive colonization till clearance and on the modulation of the adaptive immune response against TcdA and TcdB.

MATERIAL AND METHODS



A) Impact of antibiotics and single reinfection

Mice were infected with *C. difficile* 630Δerm vegetative cells after induced dysbiosis. Two days after infection, the corresponding groups received two times a day on D3 and D4 post-challenge with either VAN, FDX, or MTZ. On D31 all mice were re-infected according to the previous protocol.

B) Impact of multiple reinfections

After the first infection (D0), mice were re-infected three times (D16, D29, and D37) with 7-15 days between each infection. Before each reinfection, mice only received clindamycin intraperitoneally.

Clinical score: all mice were monitored and weighed daily. CDI severity scores peaked on D2 with weight loss for all mice and diarrhea.

Development of quantitative ELISA to analyze the modulation of adaptive immune response

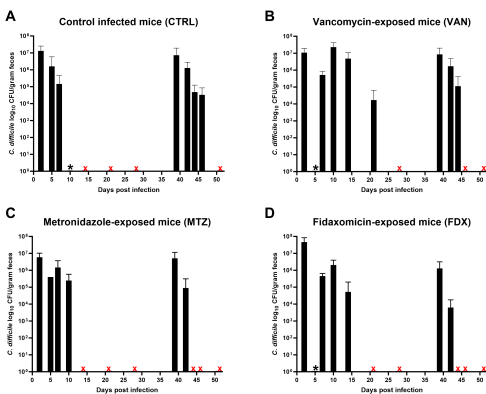
Systemic IgG anti-TcdA and anti-TcdB levels were measured in sera collected on D-7, D21, and D51 at the endpoint. Mucosal IgA anti-TcdA and anti-TcdB levels were measured in cecal content collected on D51 at the endpoint.

RESULTS

1

Impact of antibiotics (vancomycin, fidaxomicin, and metronidazole) and single reinfection

A: On *C. difficile* colonization



Infection from D-6 to D28:

- CTRL group**
 - Progressive decolonization until the clearance of detectable vegetative cells of *C. difficile* by day 14
- VAN and FDX groups**
 - *C. difficile* CFU decreased below the limit of detection
 - On D7, early relapse, associated with new clinical signs of CDI
 - Extension of the colonization period in both groups until D21 (FDX) and D28 (VAN)
- MTZ group**
 - Less effect on *C. difficile* colonization → slight increase on D7 compared to D5 → clearance of detectable vegetative cells of *C. difficile* by day 14

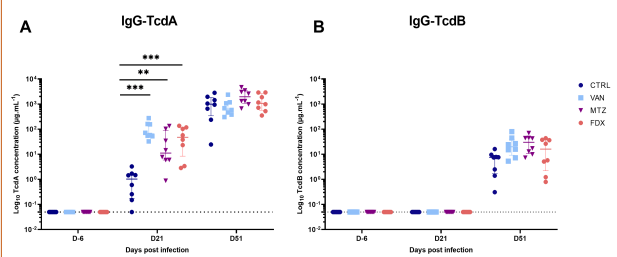
Reinfection from D31 to D51:

- Rapid clearance of *C. difficile* compared to the first infection
- Less clinical signs of CDI compared to the first infection in all groups

* = detectable *C. difficile* vegetative cells CFU below the limit of detection (10^2)
x = *C. difficile* vegetative cells not detectable

Short exposition of vancomycin, fidaxomicin, and metronidazole induced different outcomes of *C. difficile* colonization

B: On the adaptive immune response



*p-value <0.05; **p-value <0.01; ***p-value <0.001

- Day 21** → anti-TcdA IgG levels were significantly elevated in antibiotics-exposed groups compared to the CTRL
→ anti-TcdB IgG was not detectable

- Day 51 (after reinfection)** → anti-TcdA IgG levels reached a steady state in all groups → suggesting a cumulative effect in the antibody response

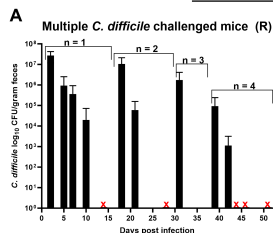
→ anti-TcdB IgG levels were low after reinfection compared to anti-TcdA IgG levels → need a second contact for the production of anti-TcdB IgG

Short exposition of antibiotics enhances the adaptive immune response

2

Impact of multiple reinfections

A: On *C. difficile* colonization



First infection

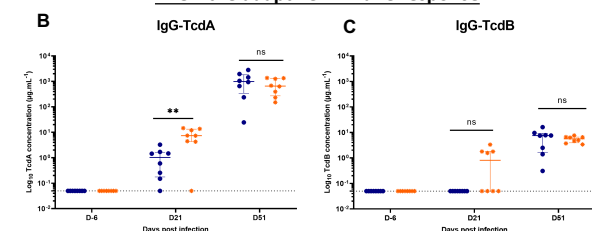
→ Progressive decolonization until the clearance of detectable vegetative cells of *C. difficile* by day 14 as observed in the CTRL group

After each reinfection

→ Faster clearance of *C. difficile*
→ Less clinical signs of CDI compared to the previous infection

x = *C. difficile* vegetative cells not detectable

B: On the adaptive immune response



*p-value <0.05; **p-value <0.01; ***p-value <0.001

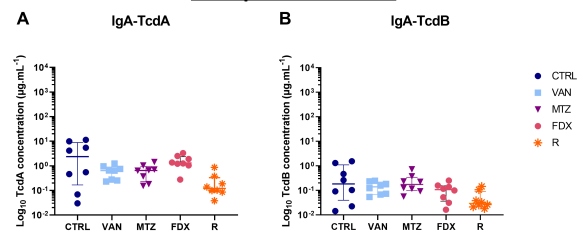
- Day 21 (after two infections)** → anti-TcdA IgG levels were significantly elevated compared to the CTRL; anti-TcdB IgG was not detectable

- Day 51 (after four infections)** → anti-TcdA IgG levels reached a steady state → suggesting a cumulative effect in the antibody response; anti-TcdB IgG levels were low after four infections compared to anti-TcdA IgG levels

Prolonged or repeated exposure to *C. difficile* optimizes the immune response

3

Mucosal IgA levels against *C. difficile* toxins after single and multiple reinfections



→ Low anti-TcdA and anti-TcdB IgA levels in all groups

Mucosal IgA levels against *C. difficile* toxins are lower in comparison to IgG levels

CONCLUSION

Short exposition to both VAN and FDX were unable to completely eliminate *C. difficile*. Some spores and vegetative cells that were undetectable with the culture method remained, leading to early relapse associated with clinical signs of CDI after discontinuation of vancomycin and fidaxomicin therapy. In contrast, MTZ has less to no effect on colonization by *C. difficile*. Nevertheless, the persistence of colonization after treatment appears to enhance the adaptive immune response. Furthermore, we demonstrate that prolonged and repeated contact with *C. difficile* optimizes the immune response and eventually reaches a steady state. It would be interesting to evaluate the duration of this response. Our findings also suggest that antibodies produced during the first infection may neutralize toxins effect and confer protection against subsequent reinfection.

Titre : Etude des facteurs influençant la dynamique de la colonisation digestive par *Clostridioides difficile* et de la réponse immune adaptative

Mots clés : *Clostridioides difficile*, microbiote digestif, réponse immune adaptative, modèle animal

Résumé : *Clostridioides difficile* est un bacille Gram-positif anaérobie sporulant, producteur de toxines qui sont responsables de diarrhées post-antibiotique. Les infections à *C. difficile* (ICD) sont caractérisées par un taux important d'évolution vers des récurrences (20-35%). La réponse immune adaptative de l'hôte joue un rôle central dans l'évolution des ICD.

Nous avons montré dans un modèle d'ICD chez la souris qu'une brève exposition aux antibiotiques perturbe la dynamique de la colonisation digestive conduisant dans certains cas à une récurrence précoce. Afin d'évaluer l'impact de ces différents traitements sur la réponse immune, nous avons mis au point un test ELISA quantitatif pondéral. On observe une différence de mise en place de la réponse immune adaptative après la première infection, avec une réponse plus précoce et des taux plus élevés d'anticorps sériques anti-toxines pour les groupes traités.

La réinfection conduit à une colonisation digestive mais sans signes cliniques de l'infection ou des manifestations cliniques atténuées en lien avec la production d'anticorps neutralisant et suggérant un corrélat de protection. Les taux d'anticorps anti-toxines sériques (IgG) produits sont équivalents quels que soient les groupes après une ou plusieurs réinfections. Le contact prolongé et répété avec la bactérie amène à une réponse plus précoce et plus importante jusqu'à l'observation d'un plateau de réponse. Ces premiers résultats mettent en évidence la variabilité de la réponse aux traitements sur la dynamique de la colonisation digestive et sur la réponse immune adaptative. L'analyse du microbiote intestinal et du profil des acides biliaires dans les selles (par UHPLC ESI-MS-HR) au cours du processus infectieux sont des perspectives complémentaires à ce travail.

Title: Study of factors influencing the dynamics of digestive colonization by *Clostridioides difficile* and the adaptive immune response

Keywords: *Clostridioides difficile*, gut microbiota, adaptive immune response, animal model

Abstract: *Clostridioides difficile* is Gram-positive anaerobic spore-forming, toxins-producing bacillus that is responsible for post-antibiotic diarrhea. *C. difficile* infections (CDI) are characterized by a high rate of recurrence (20-35%). The host's adaptive immune response plays a central role in the evolution of CDI.

We have shown in a mouse model that short exposure to antibiotics disrupts the dynamics of digestive colonization, leading in some cases to early recurrence. To analyze the impact of these different treatments on the immune response we have developed a quantitative ELISA. We observe a difference in the development of the adaptive immune response after the first infection, with earlier and higher levels of serum anti-toxin antibodies in the antibiotics-treated groups.

Reinfection leads to digestive colonization without clinical signs of infection, or to attenuated clinical signs associated with the production of neutralizing antibodies, suggesting a correlate of protection. The levels of serum (IgG) anti-toxin antibodies produced are equivalent for all groups after one or multiple reinfections. Prolonged and repeated contact with the bacteria leads to an earlier and greater response until reaching a steady state. These initial results highlight the variability of the response to treatment in terms of the dynamics of digestive colonization and the adaptive immune response. Analysis of the intestinal microbiota and the profile of bile acids in stools (by UHPLC ESI-MS-HR) during the infectious process are complementary perspectives to this work.